

Multiphotonen-Lasertomographie des Malignen Melanoms der Haut

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Enrico Dimitrow
geboren am 12.05.1978 in Leipzig

Gutachter:

1. Prof. Dr. J. Norgauer, Jena
2. PD Dr. U. Markert, Jena
3. PD Dr. M. Idzko, Freiburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.10.2009

Abkürzungsverzeichnis

Fachbezogene Abkürzungen

CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy (dt. konfokale Laserscanning-mikroskopie)
DMSO	Dimethylsulfoxid
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging (dt. Fluoreszenzlebensdauer-messung)
LED	Light Emitting Diode (dt. lichtemittierende Diode)
MLT	Multiphoton Laser Tomography (dt. Multiphotonen-Lasertomographie)
MM	Malignes Melanom
MRT	Magnetresonanztomographie
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)
NIR	Near Infrared (nahe Infrarotstrahlung im Wellenlängenbereich von 700-1400 nm)
NPV	Negative Predictive Value (negativer Vorhersagewert)
NZN	Nävuszellnävus
OCT	Optical Coherence Tomography (dt. optische Kohärenztomographie)
PMT	Photo Multiplier Tube (dt. Photomultiplier oder Lichtdetektor)
PPV	Positive Predictive Value (positiver Vorhersagewert)
S ₀	Grundzustand von Elektronen (niedriges Energieniveau)
S ₁	angeregter Schwingungszustand von Elektronen (gehobenes Energieniveau)
SHG	Second Harmonic Generation (dt. Frequenzverdopplung)
SPC	Single Photon Counting (dt. Einzelphotonenzählung)
TCSPC	Time Correlated Single Photon Counting (dt. zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung)
UV	ultraviolett (ultraviolette Strahlung im Wellenlängenbereich von 100-400 nm)
VIS	visible (sichtbare Strahlung im Wellenlängenbereich von 400-700 nm)

Abkürzungen für physikalische Größen und Einheiten

a_1	Amplitude der Komponente 1 der Fluoreszenzlebensdaueremessung
a_2	Amplitude der Komponente 2 der Fluoreszenzlebensdaueremessung
c	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum ($\sim 3 \times 10^8$ m/s)
cm	Zentimeter ($1 \text{ cm} = 10^{-2} \text{ m}$)
δ	Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitt
ξ	Zweiphotonen-„advantage“-Faktor
Φ	Photonenflußdichte
f	Frequenz
F_p	Pulsfolgefrequenz
fs	Femtosekunde ($1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$)
h	Planck'sches Wirkungsquantum
Hz	Hertz ($1 \text{ Hz} = 1 \text{ s}^{-1}$)
I	Intensität
kHz	Kilohertz ($1 \text{ kHz} = 10^3 \text{ Hz}$)
λ	Wellenlänge
λ_{ex}	Anregungswellenlänge
m	Meter
MHz	Megahertz ($1 \text{ MHz} = 10^6 \text{ Hz}$)
mm	Millimeter ($1 \text{ mm} = 10^{-3} \text{ m}$)
μm	Mikrometer ($1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$)
mW	Milliwatt ($1 \text{ mW} = 10^{-3} \text{ W}$)
NA	Numerische Apertur
n_a	Wahrscheinlichkeit für die simultane Absorption von 2 Photonen
nm	Nanometer ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$)
P	Leistung
ps	Pikosekunde ($1 \text{ ps} = 10^{-12} \text{ s}$)
s	Sekunde
t	Zeit
τ	Fluoreszenzlebensdauer
τ_1	Fluoreszenzlebensdauer der Komponente 1
τ_2	Fluoreszenzlebensdauer der Komponente 2
W	Watt

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	7
2 Einleitung	9
2.1 Aufbau der Haut	9
2.2 Das melanozytäre System der Haut	11
2.3 Der melanozytäre Nävus	12
2.4 Das Maligne Melanom	13
2.5 Bildgebende Verfahren in der Dermatologie	14
2.6 Fluoreszenzdiagnostik	17
2.7 Endogene Fluorophore	22
3 Ziele der Arbeit	25
4 Material und Methoden	26
4.1 Aufbau der Studie	26
4.2 Gewebeproben (Vorstudie)	26
4.3 Probandenkollektiv (Hauptstudie)	26
4.4 Probandenaufklärung	27
4.5 Das Lasersystem DermaInspect	27
4.6 Durchführung der MLT-Messung	30
4.7 Detektionsverfahren	33
4.8 Korrelation der MLT-Bilddaten	36
4.9 Datenauswertung	38
5 Ergebnisse	40
5.1 Messung der Fluoreszenzintensität	40
5.2 Selektive Fluoreszenzanregung	44
5.3 MLT-Merkmale gesunder Haut	45
5.4 MLT-Merkmale melanozytärer Nävi	46
5.5 MLT-Merkmale Maligner Melanome	48
5.6 Statistische Auswertung	50
5.7 Messung der Fluoreszenzabklingkinetik	56
5.8 Messung der Fluoreszenzspektren	59
6 Diskussion	60
6.1 Multiphotonen angeregte Fluoreszenzbildgebung	60
6.2 Selektive Melaninfluoreszenz	61

6.3 Statistische Auswertung	62
6.4 Fluoreszenzabklingkinetik	67
6.5 Fluoreszenzspektren	69
6.6 Vor- und Nachteile der MLT	70
6.7 Technische Optimierung der MLT	71
7 Schlussfolgerungen	72
8 Literaturverzeichnis	73
9 Anhang	80

1 Zusammenfassung

Das Maligne Melanom ist der bösartigste Hautkrebs des Menschen. In Folge eines geänderten Freizeitverhaltens, zunehmender globaler UV-Belastung und steigender Lebenserwartung hat sich die Inzidenz des Melanoms im letzten Jahrzehnt in Deutschland verdoppelt. Damit ist das Maligne Melanom der Tumor mit dem stärksten Inzidenzanstieg aller invasiven Tumoren überhaupt. Gegenwärtig treten ca. 22000 Neuerkrankungen und ca. 2300 Todesfälle im Bundesgebiet auf. Leider sind davon zunehmend jüngere Patienten betroffen. Einzig die rechtzeitige Erkennung in frühen Entwicklungsstadien gewährleistet eine gute Prognose. Gerade hier zeigt sich jedoch eine besondere Schwierigkeit. Die nichtinvasive Diagnostik melanozytärer Hautveränderungen erfolgt nach wie vor anhand klinischer und auflicht-mikroskopischer Befunde, mit einer Sensitivität von 60-80%, die abhängig von der Erfahrung des Untersuchers ist. Die daraus resultierende diagnostische Unsicherheit kann zum einen die Exzision einer suspekten Läsion verzögern oder aber, weitaus häufiger, die operative Entfernung überwiegend histologisch harmloser Nävi begünstigen. Einzig die Histopathologie als zeit- und kostenintensives Verfahren erlaubt die eindeutige Klassifizierung melanozytärer Läsionen.

Zur Optimierung der Melanomdiagnostik erfolgten zahlreiche Neu- und Weiterentwicklungen im Bereich der nichtinvasiven Bildgebung. Dabei galt den optischen Verfahren besonderes Interesse. Neben der optischen Kohärenztomographie und der konfokalen Laserscanningmikroskopie wurde auch die multiphotonen-angeregte Autofluoreszenz endogener Biomoleküle (u. a. NAD(P)H, Melanin, Elastin, Kollagen) untersucht. Die Vorteile dieses Verfahrens gegenüber der konventionellen, ultraviolett-angeregten Autofluoreszenz sind eine verbesserte Eindringtiefe mit hoher Orts- und Tiefenauflösung bei geringem Schädigungspotenzial der verwendeten NIR-Strahlung. Die Multiphotonen-Lasertomographie (MLT) repräsentiert ein neues, nichtinvasives Untersuchungsverfahren, das geeignet ist, lebendes Gewebe auf zellulärem Level mehrdimensional abzubilden.

Ziel der Arbeit war die morphologische Beurteilung melanozytärer Hautveränderungen mittels MLT. Dabei standen die vergleichende Charakterisierung benigner und maligner Läsionen sowie die Evaluierung der diagnostischen Anwendbarkeit des Verfahrens im Vordergrund.

Von 2003 bis 2006 wurden an 115 Patienten der Universitätsklinik Jena melanozytäre Hautveränderungen mit Hilfe der Multiphotonen-Lasertomographie untersucht. Die dabei gewonnenen Schnittbilder dienten der Erstellung eines Kriterienkataloges mit charakteristischen Differenzierungsmerkmalen des Malignen Melanoms. Im Rahmen einer systematischen und verblindeten Bildbeurteilung durch 4 unabhängige Untersucher wurde die Zuverlässigkeit und Signifikanz der Kriterien an ca. 5000 optischen Schnittbildern überprüft.

Die Ergebnisse zeigen deutliche morphologische Veränderungen der Zyto- und Histoarchitektur des Malignen Melanoms im Vergleich zu benignen melanozytären Läsionen. Für die diagnostische Klassifizierung mittels MLT konnte eine Sensitivität und Spezifität von 84% und 76% ermittelt werden. Ferner gelang es, Melanozyten selektiv darzustellen und Veränderungen der Fluoreszenzabklingkinetik sowie des Emissionsspektrums beim Malignen Melanom nachzuweisen.

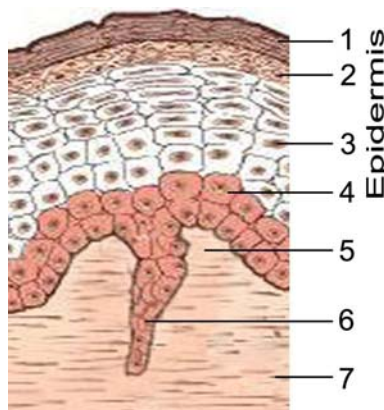
Die Multiphotonen-Lasertomographie erlaubt eine nichtinvasive Untersuchung melanozytärer Läsionen mit einer zur Lichtmikroskopie vergleichbaren Auflösung (horizontal $<1\ \mu\text{m}$, vertikal $<2\ \mu\text{m}$). Im Unterschied zu anderen bildgebenden Verfahren der Dermatologie (Dermatoskopie, Sonographie, Magnetresonanztomographie, optische Kohärenztomographie, konfokale Laserscanningmikroskopie) ermöglicht die MLT eine simultane Erhebung morphologischer, fluoreszenzdynamischer und spektraler Daten. Derart erhält der Untersucher umfangreiche Informationen über die strukturelle sowie biochemische Gewebebeschaffenheit. Ergänzend zur klinischen Routinediagnostik kann die MLT sowohl im Rahmen der Melanomfrüherkennung als auch in der Verlaufsbeurteilung suspekter Hautveränderungen eingesetzt werden.

2 Einleitung

2.1 Aufbau der Haut

Die Haut ist mit einer Fläche von 1,5–2 m² das größte Organ des Menschen. Von außen nach innen betrachtet besteht die Haut aus folgenden Schichten (Abb. 1):

- Epidermis (Oberhaut)
- Dermis oder Corium (Lederhaut)
- Subkutis (Unterhaut)



1. Stratum corneum (Hornzellschicht)
2. Stratum granulosum (Körnerzellschicht)
3. Stratum spinosum (Stachelzellschicht)
4. Stratum basale (Basalzellschicht)
5. dermale Papille
6. Reteleiste
7. Dermis

Abb. 1: Aufbau der Haut (modifiziert nach BSMO GmbH, www.lifeline.de/.../haut.jpg)

Die Epidermis ist der äußerste Anteil der Haut und übernimmt als mehrschichtig verhornendes Plattenepithel eine wichtige Schutzfunktion des menschlichen Körpers gegenüber der Außenwelt. Ihre Dicke variiert in Abhängigkeit von Lokalisation, Alter und Geschlecht zwischen 50 µm (z. B. Augenlid) und 2000 µm (z. B. Fußsohle). Neben den Plattenepithelzellen (Keratinocyten), die in mehreren Schichten übereinander angeordnet sind, enthält sie Zellen des Immunsystems (Langerhans-Zellen), pigmentbildende Zellen (Melanozyten) sowie Zellen des peripheren Nervensystems (Merkel-Zellen).

Die Epidermis wird in 5 verschiedene Zellschichten unterteilt. Das Stratum basale (Basalzellschicht) übernimmt als unterste Schicht regenerative Aufgaben. Die zylindrischen, linear entlang der Basalmembran angeordneten Zellen sind in der Lage, sich zu teilen. Durch Zellteilung neu gebildete Keratinocyten durchwandern innerhalb von 27 Tagen die Epidermis, differenzieren sich zu Hornzellen und werden schließlich an der Hautoberfläche abgestoßen. Während dieses Reifungsprozesses passieren sie das Stratum spinosum (Stachelzellschicht), welches sich nach oben

der Basalzellschicht anschließt, das Stratum granulosum (Körnerzellschicht), das Stratum lucidum (Glanzschicht) sowie das Stratum corneum (Hornzellschicht), das in direktem Kontakt zur Umwelt steht. Das Stratum spinosum ist durch 2-5 Lagen kubischer Zellen mit zentralem Kern gekennzeichnet. Zwischen den Zellen sind zahlreiche Zell-Zellkontakte in Form von Desmosomen ausgebildet. Die mit Keratohyalin granula angereicherten Keratinozyten des darüber liegenden Stratum granulosum ordnen sich in 1-3 abgeflachten Zelllagen an. In dieser Schicht gehen die Zellen allmählich in die Apoptose über, der Zellkern und die Zellorganellen werden abgebaut. Das darüber liegende Stratum lucidum findet sich nur in Regionen mit einer dicken Epidermis (Handflächen, Fußsohlen) und kommt als dünne homogene Schicht zur Darstellung. Das Stratum corneum ist die am oberflächlichsten gelegene Epidermisschicht und besteht aus 10 bis 20 Zelllagen abgestorbener, kernloser Hornzellen (Korneozyten). Diese imponieren als flache, hexagonale Zellkörper, die vollständig mit dicht gepackten Keratinfilamenten ausgefüllt sind.

Unterhalb der Basalzellschicht befindet sich die Dermis (Lederhaut). Diese ist über die Basalmembran mit der Epidermis verbunden. Die Kontaktzone wird als dermo-epidermale Junktionszone bezeichnet. Epidermis und Dermis sind in Abhängigkeit von der mechanischen Beanspruchung unterschiedlich stark miteinander verzahnt. Dabei ragen epidermale Reteleisten in die Dermis und dermale Papillen in die Epidermis. Innerhalb der Dermis werden 2 ineinander übergehende Schichten unterschieden, das Stratum papillare (Papillenschicht) und das darunter liegende Stratum reticulare (Netzschicht). Das dünnere Stratum papillare besteht aus lockerem Bindegewebe mit Fibroblasten, sowie Zellen des Immunsystems (Makrophagen, Mastzellen, Lymphozyten) und des Nervensystems (Meissnersche Tastkörperchen). Das Bindegewebe wird von elastischen und kollagenen Fasern sowie Lymph- und Blutgefäßen durchzogen. Im Stratum reticulare, dem unteren Dermisanteil, findet sich ein straffes Bindegewebe mit einem hohen Faseranteil und geringer Zellzahl. Dort sind die Anlagen der Haarfollikel sowie Schweiß- und Talgdrüsen, deren Ausführungsgänge die Dermis und Epidermis durchziehen, lokalisiert. Die Dermis kann abhängig vom Alter und der Lokalisation unterschiedliche Dicken annehmen. Dabei reicht die Varianz von mehreren hundert Mikrometern bis zu 2,4 mm an den Hand- und Fußflächen.

An die Dermis schließt sich die Subkutis an. Sie besteht aus lockerem Bindegewebe mit eingelagerten Fettzellen. In ihr finden sich Blut- und Lymphgefäße sowie Nervenzellen und Rezeptoren (Vater-Pacini-Körperchen). Je nach Alter, Geschlecht, Körperregion und Ernährungszustand variiert ihre Dicke erheblich (Fritsch 1998).

2.2 Das melanozytäre System der Haut

Die pigmentbildenden Zellen der Haut (Melanozyten) entstammen der Neuralleiste und wandern während der Embryonalentwicklung als Melanoblasten in die Haut ein. Dort finden sie sich innerhalb der Basalzellschicht, in den Haarfollikeln und vereinzelt auch in der Dermis (Abb. 2). Die vom Zellkörper der Melanozyten ausgehenden Fortsätze (Dendriten) verlaufen zwischen den Keratinozyten der Basal- und Stachelzellschicht und stehen mit diesen in Form einer strukturellen wie funktionellen epidermalen Melanineinheit in Verbindung (Fitzpatrick und Breathnach 1963). Auf diese Art interagiert ein Melanozyt mit etwa 36 Keratinozyten (Quevedo et al. 1974). Die Hauptfunktion der Melanozyten besteht in der Synthese des Pigmentes Melanin. Man unterscheidet in menschlicher Haut 2 Subtypen, das gelb-rote Phäomelanin und das schwarz-braune Eumelanin. Das Mischungsverhältnis der beiden Varianten ist mitbestimmend für den Hauttyp eines Menschen. So ist z. B. bei hellhäutigen, rothaarigen Menschen (nordischer Typ) das Phäomelanin dominierend, während beim mediterranen bis hin zum negroiden Typ das schwarz-braune Eumelanin vermehrt auftritt (Thody et al. 1991). Die Melaninsynthese kann durch physikalische Reize (UV-Strahlung), hormonelle Faktoren und Entzündungsmediatoren beeinflusst werden und erfolgt durch enzymatische Oxidation der Aminosäure Tyrosin innerhalb der Melanosomen (zytoplasmatische Vesikel). Diese wandern zu den Spitzen der Melanozytenfortsätze, werden dort freigesetzt und von den umliegenden Keratinozyten phagozytiert. Durch retrograde intrazelluläre Transportvorgänge kommt es zur supranukleären Melaninanreicherung innerhalb der Keratinozyten (Byers et al. 2003). Der Abbau der Melaningranula erfolgt durch lysosomale Enzyme. Die Dichte der Melanozyten ist von der Körperregion abhängig und variiert zwischen $1000/\text{mm}^2$ (z. B. Hüfte) und $2000/\text{mm}^2$ (z. B. Genitalien) (Quevedo und Holstein 1998). Die Anzahl der Melanozyten ist bei allen Menschen gleich, unabhängig von Geschlecht und Rasse. Unterschiede in der Hautfarbe lassen sich hauptsächlich auf die Zahl der Melanosomen in den Keratinozyten zurückführen.

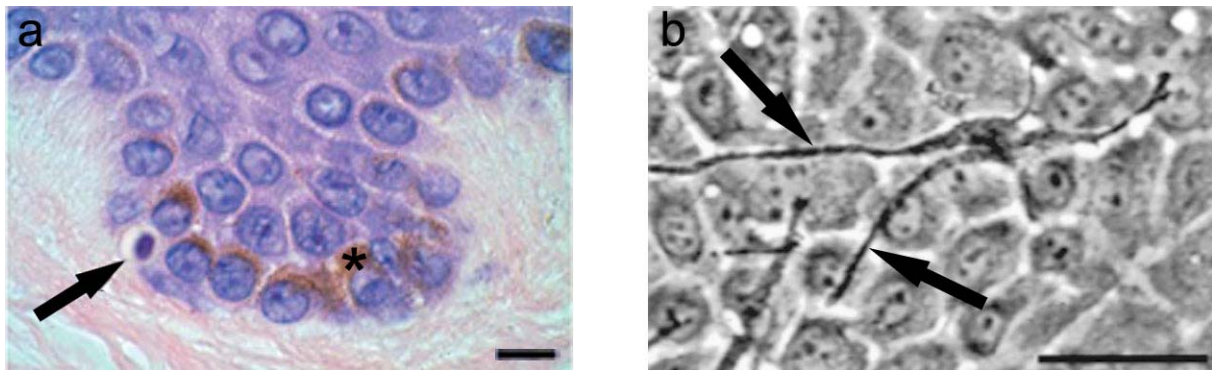


Abb. 2: Melanozyten - a: einzelner Melanozyt (Pfeil) umgeben von basalen Keratinozyten mit supranukleären Melanin-Kappen (Stern) im histologischen Schnitt (HE-Färbung), Messbalken=10 µm (modifiziert nach Marcus Braun-Falco, TU München); b: phasenkontrast-mikroskopische Aufnahme einer Melanozyten/Keratinozyten-Kultur mit dendritischen melanozytären Zellfortsätzen (Pfeile), Messbalken=50 µm (modifiziert nach Byers et al. 2003)

2.3 Der melanozytäre Nävus

Der melanozytäre Nävus wird im Volksmund, aufgrund seiner braunen Farbe, auch als Leberfleck bezeichnet. Melanozytäre Nävi sind durch eine fokale Vermehrung von Pigmentzellen (Melanozyten) charakterisiert. Ihr Erscheinungsbild kann sehr unterschiedlich sein. Häufig jedoch findet man hell- bis dunkelbraune, scharf begrenzte, zum Teil erhabene Pigmentmale unterschiedlicher Größe.

Man unterscheidet kongenitale (angeborene) und erworbene sowie typische und atypische, in Form und Farbe stark variierende Nävi. Weniger als 1% der Neugeborenen weisen einen kongenitalen Nävus auf (Nordlund und Ortonne 1998). Es handelt sich meist um scharf begrenzte, zum Teil behaarte Tumoren mit homogener Farbe, die im Laufe des Lebens ihr Aussehen verändern. Ab einer Größe von mehreren Zentimetern weisen sie ein erhöhtes Risiko der neoplastischen Umwandlung auf. In Extremfällen können Sie als sogenannte Tierfellnävi große Teile des Integumentes einnehmen und im Rahmen neurokutaner Syndrome auch die Hirnhäute befallen (Ruiz-Maldonado et al. 1997).

Weitaus häufiger findet man erworbene Nävi. Diese entwickeln sich vorwiegend im Kindes-, Jugend- und jungen Erwachsenenalter. Studien zeigten, dass die Häufigkeit entsprechend der Sonnenexposition in frühen Lebensjahren, der Anzahl von Sonnenbränden und der Hautfarbe (Hauttyp I und II nach Fitzpatrick) steigt (English und Armstrong 1994, Gallagher et al. 1990).

Erworbene melanozytäre Nävi durchlaufen verschiedene Entwicklungs- und Reifungsstadien mit unterschiedlichen klinischen und histopathologischen

Merkmalen. Ausgehend von Pigmentzellaggregaten entlang der dermoepidermalen Junktionszone (Junktionsnävus) kann es zur Verlagerung von Melanozyten in die Dermis kommen. Der sich dabei entwickelnde Compoundnävus besitzt sowohl epidermale als auch dermale Anteile. Finden sich die Nävuszellnester ausschließlich innerhalb der Dermis, spricht man vom dermalen Nävus. Die dermalen Melanozyten weisen oft kleinere Zellkerne auf und verlieren zur Tiefe hin die Fähigkeit zur Pigmentbildung. Nävi verändern sich im Laufe des Lebens langsam. Mit zunehmendem Alter der Läsion nimmt die Pigmentierung ab (Weedon 1997). Dies führt dazu, daß sich ein Teil der Nävi ab der fünften Lebensdekade klinisch zurückbildet (Nordlund und Ortonne 1998). Die Anzahl typischer und atypischer melanozytärer Nävi ist der wichtigste bekannte unabhängige Risikofaktor für die Entwicklung eines Malignen Melanoms (Bauer und Garbe 2003).

2.4 Das Maligne Melanom

Das Maligne Melanom (MM) ist ein hochgradig bösartiger, invasiv wachsender Tumor, der von den Melanozyten ausgehend vorrangig die Haut, aber auch die Schleimhäute, befällt. Man unterscheidet folgende Subtypen: Superfiziell spreitendes Melanom (SSM), Noduläres Malignes Melanom (NMM), Lentigo maligna Melanom (LMM) und das Akrolentiginöse Melanom (ALM). Diese klinisch-histologischen Formen können auch pigmentfrei als Amelanotische Maligne Melanome (AMM) in Erscheinung treten. Das Superfiziell spreitende Melanom ist mit 65% aller Fälle der häufigste Subtyp. Bezüglich der Inzidenz ist in Deutschland seit Beginn der 70er Jahre eine deutliche Zunahme der registrierten Fälle zu verzeichnen (Garbe und Blum 2001, Welch et al. 2005). Dabei stiegen die Neuerkrankungen bis auf 18 Fälle pro 100000 Einwohner und Jahr an (Stang et al. 2007). Weitaus bedenklicher sind die Neuerkrankungsraten in Regionen mit erhöhter UV-Exposition (USA, Australien) mit bis zu 60 Fällen pro 100000 Einwohner und Jahr (Garbe und Blum 2001). Neben genetischen Aspekten wird insbesondere der Einfluss des UV-Lichtes als ätiologischer Risikofaktor diskutiert (Rivers 2004). Dabei bewirken die einfallenden UV-Strahlen photochemische Veränderungen an der DNA des Zellkerns. Beim Versagen der körpereigenen Reparaturmechanismen kommt es zur malignen Transformation und im Weiteren zu einer unkontrollierten Proliferation der Melanozyten. Als prädisponierende Risikofaktoren gelten ein heller Hauttyp sowie die

Anzahl UV-induzierter Nävi im Kindesalter (0-6 Jahre) (Dulon et al. 2002). Personen mit einer hohen Nävuszahl (NZN>50; atypische NZN>5) sind besonders gefährdet (Bauer und Garbe 2003). Ihr Melanomrisiko ist um den Faktor 4 bis 5 erhöht.

Aufgrund der schnellen Metastasierung des Malignen Melanoms ist eine rechtzeitige Erkennung in frühen Entwicklungsstadien von entscheidender Bedeutung für die Prognose des Patienten. Die klinische Diagnostik stützt sich neben der Anamnese auf die inspektorische Beurteilung der Läsion. Seit 1981 wird ergänzend die Dermatoskopie (Auflichtmikroskopie) angewandt. Dadurch konnte die Sensitivität diagnostischer Entscheidungen, in Abhängigkeit von der Erfahrung des Untersuchers, um bis zu 27% gesteigert werden (Mayer 1997, Westerhoff et al. 2000).

2.5 Bildgebende Verfahren in der Dermatologie

Dermatoskopie (Auflichtmikroskopie)

Das Dermatoskop ist vom Aufbau her ein Mikroskop mit einer festen Vergrößerung. Es wird direkt auf die Hautoberfläche gesetzt. Eine im Gerät integrierte Lampe (Halogen, LED) beleuchtet die Haut unter einem typischen Winkel von 20°. Aufgrund der Einkopplung des Lichtes über die mit Flüssigkeit (z. B. Immersionsöl) benetzte Hautoberfläche wird der Brechungsindex an der Kontaktstelle soweit angeglichen, dass sich der Anteil des reflektierten Lichtes stark verringert und somit tiefer liegende Hautstrukturen zur Darstellung kommen. Mit dem Dermatoskop lassen sich ergänzend zur inspektorischen Beurteilung zusätzliche Informationen über das Pigmentnetz, die Farbgebung sowie die Kapillareinsprossung einer Läsion erhalten (Braun et al. 2005).

Computergestützte Auflichtmikroskopie

Die Datenerfassung erfolgt mittels Farb-CCD-Kamera analog zur Auflichtmikroskopie durch direkten Kontakt der Optik mit der Haut. Das untersuchte Hautareal wird vergrößert auf einem Monitor dargestellt und kann computergestützt analysiert werden (Abb. 3a). Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode liegt in der digitalen Speicherung der Bilddaten, die eine regelmäßige Verlaufsbeurteilung auffälliger Hautveränderungen insbesondere bei Patienten mit zahlreichen melanozytären Nävi ermöglicht (Kittler 2003).

Sonographie

Die Sonographie basiert auf der Anwendung von Ultraschallwellen. Durch ein elektrisches Wechselfeld wird ein Piezokristall deformiert und zu mechanischen Schwingungen angeregt. Die Frequenzen liegen im Ultraschallbereich ($f > 20$ kHz) und sind somit für das menschliche Ohr nicht wahrnehmbar. Die Ultraschallwellen gelangen durch direkten Kontakt des Schallkopfes mit dem Körper des Patienten in das zu untersuchende Hautareal und werden dort entsprechend der Gewebeart unterschiedlich stark absorbiert sowie reflektiert. Die reflektierten Schallwellen werden beim Verlassen des Gewebes vom Schallkopf detektiert und in elektrische Impulse (piezoelektrischer Effekt) umgewandelt (Korting et al. 1999). Die daraus berechneten Schalllaufzeiten und Schallamplituden können zur Darstellung eines zweidimensionalen Schnittbildes genutzt werden (Abb. 3b).

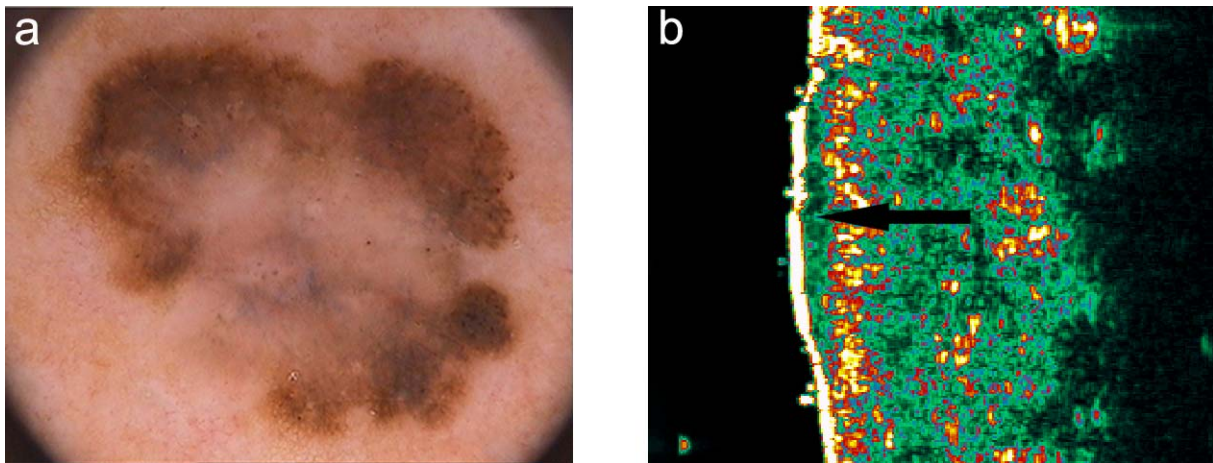


Abb. 3: Computergestützte Auflichtmikroskopie (a) und 20-MHz-Sonographie (b) eines MM. Im Ultraschall zeigt sich der Tumor als echoarme Zone (Pfeil) innerhalb der oberen Dermis.

Magnetresonanztomographie (MRT)

Die physikalische Grundlage der Magnetresonanztomographie bildet die Kernspinresonanz. Dabei nutzt man den Umstand, dass Protonen sowie Neutronen einen Eigendrehimpuls (Spin) besitzen und Atomkerne dadurch ein magnetisches Moment erhalten. Durch äußere, in den Körper eingestrahlte Magnetfelder kommt es zur einheitlichen Neuausrichtung der Wasserstoffkerne (Protonen), die nach dem Abschalten des äußeren Magnetfeldes in ihre ursprüngliche Position zurückfallen und dabei ein messbares Signal abgeben. Dieses wird nach unterschiedlichen Kriterien (T1/T2-Relaxationszeit) ausgewertet und in Graustufen codiert dargestellt (Dössel 2000).

Optische Kohärenztomographie (OCT)

Das Grundprinzip der OCT basiert auf der Lichtinterferometrie (Gambichler et al. 2005). Dabei wird die Laufzeit eines Signals innerhalb der Gewebeprobe mit einem Referenzsignal mit bekannter optischer Weglänge verglichen. Verschiedene Signallaufzeiten entstehen durch Reflexion des Lichtes an Grenzflächen von Geweben mit unterschiedlichen Brechzahlen. Die Interferenz beider Signale ergibt ein Muster, aus dem man die relative optische Weglänge innerhalb eines A-Scans (einzelnes Tiefensignal) ermitteln kann. In eindimensionalen Rasterverfahren wird der Strahl transversal in einer oder zwei Richtungen über die Probe geführt, womit sich ein flächiger B-Scan oder mit mehreren Ebenen ein dreidimensionales Tomogramm (C-Scan) erzeugen lässt.

Konfokale Laserscanningmikroskopie (CLSM)

Ein Konfokalmikroskop ist eine Variante des Lichtmikroskops bei dem die Signaldetektion mit Hilfe einer Lochblende (pinhole) erfolgt. Es gibt zwei grundlegend unterschiedliche Betriebsweisen. Im Fluoreszenzmodus werden natürliche oder künstliche Fluorophore zur Fluoreszenz angeregt, wohingegen beim Reflektionsmodus das eingestrahlte Licht an optischen Grenzflächen des Gewebes reflektiert wird. Zur Bildentstehung können in beiden Betriebsweisen nur die Photonen beitragen, die aus der Fokusebene stammen. Die Signalanteile, die aus anderen Ebenen oberhalb oder unterhalb der Fokusebene kommen, werden durch eine sich im Strahlengang befindende Lochblende gefiltert. Dadurch ist es möglich, einzelne Gewebeschichten darzustellen (Rajadhyaksha et al. 1999). Hinter der Lochblende befindet sich ein lichtempfindlicher Detektor (PMT: photo multiplier tube). Dieser wandelt die detektierten Photonen in elektrische Signale, aus denen computergestützt ein zweidimensionales Schnittbild rekonstruiert wird. Der Durchmesser der Blende bestimmt zusammen mit dem Mikroskopobjektiv und dessen numerischer Apertur (NA) die Dicke des optischen Schnittes. Werden Schnittbilder aus verschiedenen, übereinander liegenden Fokusebenen angefertigt, so kann daraus eine dreidimensionale Rekonstruktion des mikroskopierten Objektes erstellt werden.

2.6 Fluoreszenzdiagnostik

Einphotonen-Fluoreszenzanregung

Durch die optische Anregung eines Fluoreszenzmoleküls mit einer geeigneten Lichtquelle (z. B. UV-Lichtquelle) kommt es zur Absorption von Energie in Form eines Photons. Hierbei werden die Elektronen des Moleküls in einen angeregten, energetisch höheren Zustand (S_1) versetzt (Abb. 4). Beim Übergang in den niederenergetischen Grundzustand (S_0) kommt es zur zeitversetzten Emission von Energie in Form eines neuen Photons (Fluoreszenz) (Lansing Taylor und Salmon 1989). Dabei gilt, dass das Fluoreszenzphoton die gleiche oder eine geringere Energie besitzen muss als das absorbierte Photon der Anregungsstrahlung (Stoke'sche Regel). Die Einphotonen-Fluoreszenzanregung wird im Rahmen der Fluoreszenz-CLSM genutzt. Als Anregungsquellen dienen dabei Argon-Laser (454-514 nm), Helium-Neon-Laser (543-633 nm) sowie zunehmend Festkörperlaser.

Zweiphotonen-Fluoreszenzanregung

Die molekulare Zweiphotonenanregung wurde erstmals 1931 von Maria Goeppert-Mayer theoretisch beschrieben (Goeppert-Mayer 1931). Erst mit der Entwicklung gepulster Rubinlaser, Anfang der 60er Jahre, konnten Mehrphotonenprozesse experimentell nachgewiesen werden (Kaiser und Garrett 1961). Im Gegensatz zur klassischen Einphotonenanregung kommt es dabei zur Absorption von 2 langwelligen Photonen geringer Energie. Jedes Photon für sich genommen, wäre nicht in der Lage, eine Anregung zu erzeugen. Man unterscheidet die simultane Absorption von der nichtsimultanen, stufenweisen Absorption über ein intermediäres energetisches Zwischenniveau. In beiden Fällen muss die Energie der beiden absorbierten Elektronen höher oder gleich dem Anregungszustand (S_1) sein. Zur Anregung wird üblicherweise langwellige Nahe-Infrarot (NIR: near infrared)-Strahlung verwendet. So kann z. B. mit 2 Photonen der Wellenlänge 800 nm ein Molekül angeregt werden, für das im konventionellen Einphotonen-Anregungsprozess ein Photon der Wellenlänge 400 nm notwendig wäre (Abb. 4). Im Gegensatz zur Einphotonenanregung ist das Fluoreszenzlicht kurzwelliger und energiereicher als die Anregungsstrahlung.

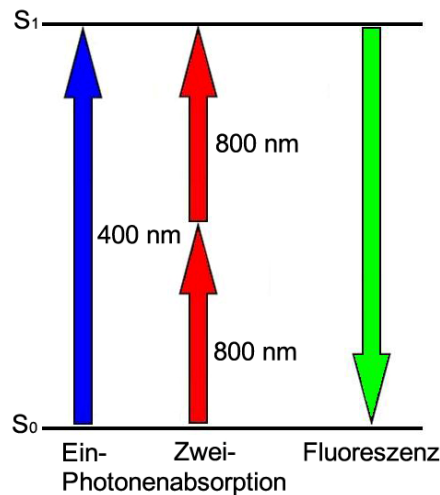


Abb. 4: Prinzip der Einphotonen- und Zweiphotonen-Fluoreszenzanregung. S_0 : energieärmerer Grundzustand, S_1 : energiereicherer Anregungszustand

Voraussetzung für die Zweiphotonenanregung ist eine hohe Energie- bzw. Photonenflußdichte (Φ) von 10^{24} bis 10^{25} Photonen $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Goeppert-Mayer 1931). Diese hohen Energiedichten werden heute durch die Verwendung von femtosekunden-gepulsten Lasern und der beugungsbegrenzten Fokussierung des Laserstrahls durch Objektive hoher numerischer Apertur erreicht. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit eines Zweiphotonen-Anregungsprozesses n_a proportional zum Quadrat der durchschnittlichen Laserleistung P (Denk et al. 1990), dem Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitt des Fluorophores δ , der vierten Potenz der Numerischen Apertur des Objektivs NA sowie dem Zweiphotonen-„advantage“-Faktor ξ . Sie ist umgekehrt proportional der Pulsfrequenz des Lasers F_p , sowie dem Quadrat des Planck'schen Wirkungsquantums h , der Lichtgeschwindigkeit c und der Anregungswellenlänge λ .

$$n_a \approx \delta (P)^2 F_p^{-1} \left(\frac{\pi NA^2}{hc\lambda} \right)^2 \xi$$

Äquivalent zu Zweiphotonenprozessen kann die Anregung endogener Fluorophore auch durch 3 Photonen erfolgen (Gryczynski et al. 1996). Dreiphotonenabsorption wurde erstmals 1964 an Naphthalinkristallen gezeigt (Singh und Bradley 1964).

Fluoreszenzabklingkinetik

Die Fluoreszenzlebensdauer τ widerspiegelt die mittlere Verweilzeit eines Moleküls im angeregten Zustand (S_1), bevor es unter Emission eines Photons in den energieärmeren Grundzustand (S_0) zurückkehrt. Sie kann durch die zeitabhängige Detektion eines nach Anregung emittierten Photons bestimmt werden (Becker et al. 2004). Dabei wird die Probe üblicherweise wiederholt mit Piko- oder Femtosekunden-Laserpulsen angeregt und die statistische Verteilung der Emissionszeiten in einem Histogramm erfasst. Dieses Histogramm wird als Fluoreszenzabklingkinetik oder Fluoreszenzabklingkurve bezeichnet. Die Zeit, bei der die Fluoreszenzintensität auf 37% des Maximalwertes abgefallen ist, wird als Fluoreszenzlebensdauer τ bezeichnet. Das Abklingverhalten folgt dabei einer exponentiellen Funktion.

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)$$

Hierbei ist $I(t)$ die Fluoreszenzintensität zur Zeit t nach dem Anregungspuls, I_0 die maximale Fluoreszenzintensität unmittelbar nach der Anregung, t die Zeit und τ die Fluoreszenzlebensdauer.

Sind verschiedene Fluorophore oder Fluoreszenzspezies innerhalb derselben Probe vorhanden, ergibt sich eine multiexponentielle Abklingkinetik der Form:

$$I(t) = \sum_{i=0}^n a_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)$$

Dabei steht n für die Gesamtzahl der Fluorophore, τ_i repräsentiert die Lebensdauer der einzelnen Fluorophore und a_i entspricht der Amplitude (relativer Anteil der jeweiligen Lebensdauer am Gesamtsignal) der einzelnen Fluorophore.

Es gilt: $a_1 + a_2 + \dots + a_n = 100\%$

Der relative Anteil eines Fluorophores f_i an der Gesamtfluoreszenz ergibt sich zu:

$$f_i = \frac{a_i \tau_i}{\sum a_i \tau_i}$$

Multiphotonen-Lasertomographie (MLT)

Mit der Entwicklung des ersten Zweiphotonen-Laserscanning-Mikroskops Anfang der 90er Jahre war der Grundstein zu einer neuen Ära der optischen Bildgebung gelegt (Denk et al. 1990). Derart konnten erstmals endogene Biomoleküle mittels langwelliger NIR-Strahlung zur Autofluoreszenz angeregt und abgebildet werden. Die digitale Speicherung horizontaler Schichtaufnahmen aus unterschiedlichen Gewebetiefen ermöglichte eine dreidimensionale Rekonstruktion des mikroskopierten Objektes. Die Weiterentwicklung hin zu medizinisch anwendbaren Geräten führte zur Multiphotonen-Lasertomographie (Koenig und Riemann 2003). Mit ihr konnten erstmals optische Schnittbilder der Haut sowohl am Probanden (*in vivo*) als auch an Gewebeproben (*ex vivo*) mit subzellulärer Auflösung und hohem Kontrast angefertigt werden. Eine Modifikation der Proben durch Fixation, Färbung oder Immunfluoreszenz entfiel.

Die Analyse der komplexen Autofluoreszenzsignale erlaubt nicht nur eine Beurteilung der Zell- und Gewebemorphologie (Riemann et al. 2004) sondern auch Aussagen zum Stoffwechselstatus der Zellen (Bird et al. 2005, Niesner et al. 2004, Zhuo et al. 2007). Weiterhin gelang es, emittierende Biomoleküle spektral wie fluoreszenz-dynamisch zu charakterisieren (Huang et al. 2002, Lakowicz et al. 1992). Zahlreiche Studien und Anwendungen der MLT in medizinischen, biologischen und pharmazeutischen Forschungsbereichen belegen die Vielseitigkeit dieser innovativen Technologie (Koenig 2008). Exemplarisch seien Untersuchungen zur Hautalterung (Koehler et al. 2006, 2008), im Bereich des Tissue Engineering (Schenke-Layland et al. 2006) sowie des Drug Screening (Koenig et al. 2006) genannt.

Besonderheiten der Multiphotonen-Lasertomographie

Durch die quadratische Intensitätsabhängigkeit nichtlinearer Anregungsprozesse werden die erforderlichen Photonenflussdichten nur innerhalb eines sehr kleinen Volumens im Fokus des Lasers (Fokusvolumen) erreicht. Durch diesen räumlich hochselektiven Anregungsprozess entfällt, im Vergleich zur Einphotonenabsorption, der sonst übliche großvolumige Anregungslichtkegel (Abb. 5). Strahlungsschäden (Photodestruktion, Photobleaching) außerhalb des Messvolumens werden erheblich reduziert.

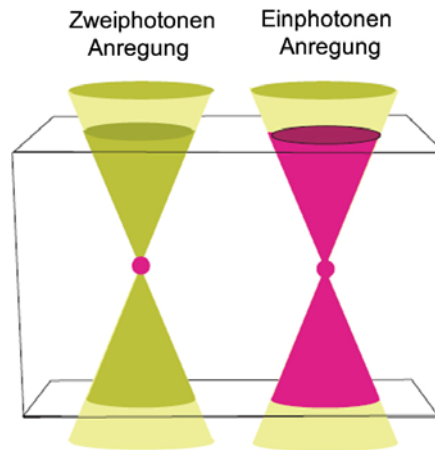


Abb. 5: Gegenüberstellung der Anregungsvolumina (pink) bei Zweiphotonenanregung (links) und Einphotonen-anregung (rechts). (modifiziert nach Center for Biomedical Imaging Technology, www.cbit.uchc.edu/microscopy/two_photon.html)

Weitere sich daraus ergebende Vorteile der Multiphotonen-Lasertomographie sind:

- wide field detection: Das gesamte Fluoreszenzsignal steht der Detektion zur Verfügung. Kein Signalverlust durch Lochblenden (Schmitt et al. 1994).
- extrem hohe (subzelluläre) Orts- und Tiefenauflösung durch Anregungsvolumen im Femtoliter-Bereich mit der Möglichkeit zur dreidimensionalen Bildgebung (Koenig und Riemann 2003)
- gute Bildqualität mit hohem Kontrast durch geringe Hintergrund- und Streuphänomene der NIR-Strahlung und vernachlässigbarer „out of focus“ Anregung
- verbesserte Eindringtiefe, bedingt durch wenige NIR-Absorber und niedrige Streuungs- und Absorptionskoeffizienten für langwellige Anregungsstrahlung (Masters et al. 1997)
- geringes Schädigungspotential durch Fluoreszenzanregung im NIR-Bereich (Fischer et al. 2006, Xu et al. 1996)
- gute Trennbarkeit der Anregungs- und Emissionswellenlängen durch große Frequenzunterschiede
- simultane Anregung im UV-, VIS- und NIR-Spektrum durch Zweiphotonenprozesse möglich (Masters und So 1999)

2.7 Endogene Fluorophore

Die effektive Nutzung von Multiphotonenprozessen für mikroskopische Zwecke erfordert genaue photophysikalische wie photochemische Kenntnisse der Anregungseigenschaften fluoreszierender Biomoleküle (Xu et al. 1996). Diese können mit bestimmten Wellenlängen besonders effektiv angeregt werden (Anregungsspektrum) und emittieren in einem spezifischen Wellenlängenbereich (Fluoreszenzspektrum). Eine Analyse der Fluoreszenzspektren zeigt, dass die Unterscheidung einzelner Fluorophore aufgrund der häufigen spektralen Überlappung schwierig ist und oft auf Basis der Emissionsmaxima allein nicht durchgeführt werden kann (Abb. 6). Ein Großteil der endogenen Fluorophore emittiert im Bereich von 450 nm bis 550 nm (Zipfel et al. 2003). Die Verifizierung einzelner Fluorophore erfordert weitere Kenntnisse zur biochemischen Gewebebeschaffenheit, den Fluoreszenzabklingzeiten oder zusätzliche immunhistochemische Färbetechniken.

Gewebsfluorophore stammen vorrangig von den aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin (Emission im UV-Bereich) sowie den Vitaminderivaten Retinol, Riboflavin und Niacin (Emission von 400-600 nm) ab (Zipfel et al. 2003). Riboflavin, als Vorstufe der Flavinnukleotide (FAD, FMN), und Niacin (Nikotinsäure), Bestandteil der Koenzyme NADH und NADPH, nehmen im Zellstoffwechsel eine zentrale Rolle ein.

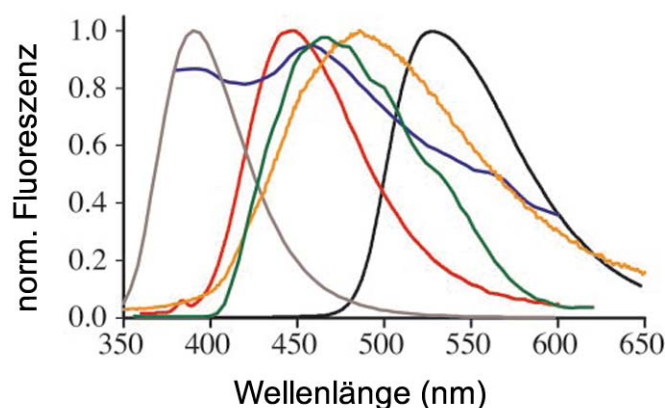


Abb. 6: Emissionsspektren fluoreszierender Biomoleküle aus der Gruppe der Vitaminderivate. Retinol (gelb), Riboflavin (schwarz), NADH (grün), Pyridoxin (grau), Folsäure (rot), Cholecalciferol (blau) (modifiziert nach Zipfel et al., 2003)

Fluorophore der Haut

Einen wesentlichen Anteil zur Autofluoreszenz der Haut, insbesondere der Zellen, tragen die Nicotinsäure-Derivate NADH und NADPH in ihren jeweils reduzierten Zustandsformen bei (Koenig und Schneckenburger 1994, Masters et al. 1997). Die oxidierten Varianten NAD^+ und NADP^+ hingegen besitzen keine Fluoreszenzeigenschaften. Nicotinamid-adenin-dinukleotid-(phosphat)e finden sich konzentriert in Mitochondrien, aber auch im Zytoplasma der Zellen (Chance und Thorell 1959). Aufgrund ihrer essentiellen Funktion als Elektronentransporter und Kofaktor zahlreicher Redoxreaktionen sind sie wichtige Indikatoren des Zellstoffwechsels (Niesner et al. 2004, Piston et al. 1995). Ein anderes am Stoffwechsel beteiligtes Fluorophor ist das intramitochondrial vorkommende Koenzym FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) als Bestandteil der stoffwechselaktiven Flavoproteine. Im Unterschied zu den Nicotinsäure-Derivaten können Flavoproteine nur im oxidierten Zustand angeregt werden. Aufgrund der im Vergleich zu NAD(P)H deutlich geringeren Konzentration, besitzt FAD nur eine untergeordnete fluoreszenzoptische Bedeutung (Huang et al. 2002).

Zu den fluoreszierenden Pigmenten gehört neben dem Melanin auch das Alterspigment Lipofuszin (Marmorstein et al. 2002). Letzteres ist Abfallprodukt des Fettsäurestoffwechsels und akkumuliert im Laufe des Lebens im Zytosol der Zellen. Melanine (gr: schwarz) sind schwarz-braune Pigmente, die die Färbung der Augen, Haare und Haut bewirken. Sie finden sich vorwiegend innerhalb von zytoplasmatischen Vesikeln, den Melanosomen. Kennzeichnend für Melanin ist, im Gegensatz zu anderen endogenen Fluorophoren, ein ungewöhnlich breites Absorptionsspektrum vom nahen Ultraviolett bis hin zum nahen Infrarot (Teuchner et al. 2000).

Porphyrine sind organische Farbstoffe, die sich beim Menschen in den roten Blutkörperchen (Erythrozyten) als Bestandteile des Hämoglobins finden. Interessanterweise wird Copro- und Protoporphyrin auch von Hautbakterien (*Propionibacterium acnes*) synthetisiert. Diese Eigenschaft macht man sich diagnostisch als Rotfluoreszenz nach UV-Anregung zu Nutze (Koenig et al. 1995). Ein weiteres Fluorophor der Haut ist die Hornsubstanz Keratin (Pena et al. 2005). Keratin ist ein Strukturprotein, das für die Form und Stabilität der Zellen zuständig ist und in hoher Konzentration im Stratum corneum sowie den Haaren und Nägeln vorkommt.

Kennzeichnend für die meisten Fluorophore ist ihr intrazelluläres Auftreten. Einzig Elastin und Kollagen bilden in der Lederhaut einen wesentlichen Bestandteil der extrazellulären Matrix und sind somit die Hauptträger der dermalen Fluoreszenz. Ein charakteristisches Phänomen des Kollagens ist die sogenannte „Frequenzverdopplung“ (SHG: second harmonic generation) (Williams et al. 2005). Dabei handelt es sich um einen nichtlinearen kohärenten Prozess, bei dem Licht der halben Anregungswellenlänge erzeugt wird (Franken et al. 1961). Die von der Dermis emittierten Photonen entstammen sowohl von Fluoreszenzprozessen als auch von SHG-Effekten (Zoumi et al. 2002).

Tabelle 1 enthält eine Übersicht der wichtigsten Fluorophore der Haut mit ihren jeweils charakteristischen Anregungs- und Fluoreszenzmerkmalen.

Tab. 1: Fluoreszenzeigenschaften endogener Fluorophore

Fluorophor	Anregungs- wellenlänge (nm)	Emissions- maximum (nm)	Anregung	Literaturquelle
Tryptophan	285	330	Einphotonen	Gryczynski et al. 1996
Tryptophan	570	330	Zweiphotonen	Gryczynski et al. 1996
Flavoproteine	430-500	520-590	Einphotonen	Masters et al. 1999
Flavoproteine	730	525	Zweiphotonen	Huang et al. 2002
NADH	355	470	Einphotonen	Lakowicz et al. 1992
NADH	730	470	Zweiphotonen	Huang et al. 2002
NAD(P)H	340	470	Einphotonen	König & Schneckenburger 1994
NAD(P)H	730	460	Zweiphotonen	Masters et al. 1998
Lipofuszin	364	555	Einphotonen	Marmorstein et al. 2002
Melanin (oxid.)	470	540	Einphotonen	Kayatz et al. 2001
Melanin	800	550	Zweiphotonen	Teuchner et al. 2003
Porphyrine	407	600, 620, 640	Einphotonen	König et al. 1995
Keratin	277	382	Einphotonen	Pena et al. 2005
Keratin	760	475	Zweiphotonen	Pena et al. 2005
Elastin	300-340	420-460	Einphotonen	König & Schneckenburger 1994
Elastin	740	480	Zweiphotonen	Zipfel et al. 2003
Kollagen	300-340	420-460	Einphotonen	König & Schneckenburger 1994
Kollagen	730, 750	525	Zweiphotonen	Zoumi et al. 2002

Aufgrund der unterschiedlichen Anregungsspektren entscheidet nicht zuletzt die Anregungswellenlänge darüber, welches Biomolekül vorwiegend zum Fluoreszenzsignal beiträgt (Huang et al. 2002).

3 Ziele der Arbeit

Das Hauptziel der Arbeit war die Evaluierung der Multiphotonen-Lasertomographie als diagnostisches Verfahren zur Differenzierung von gut- und bösartigen melanozytären Hautveränderungen. Besonderes Interesse galt dabei der morphologischen Charakterisierung melanozytärer Läsionen, insbesondere des Malignen Melanoms. Darüber hinaus sollten typische Melanommerkmale im Rahmen einer klinischen Studie überprüft und statistisch bewertet werden.

Weitere Ziele waren:

1. die Beurteilung der Anwendbarkeit der MLT sowohl am Probanden unter klinischen Bedingungen als auch an exzidierten Gewebeproben
2. die Optimierung und Standardisierung des Messvorganges
3. die Untersuchung der Anregungs- und Emissionseigenschaften wesentlicher epidermaler Fluorophore (NAD(P)H, Melanin)
4. die morphologische Charakterisierung epidermaler Zellen
5. die Ermittlung der Sensitivität und Spezifität des Verfahrens der Multiphotonen-Lasertomographie in der Differenzierung melanozytärer Läsionen
6. die Untersuchung verschiedener alternativer Detektionsmethoden (Fluoreszenzintensitätsmessung, Fluoreszenzlebensdauermessung, Messung der Emissionsspektren)
7. die Gegenüberstellung von MLT und klinisch etablierten bildgebenden Verfahren (Dermatoskopie, Sonographie)
8. die Bestimmung der Grenzen der Multiphotonen-Lasertomographie in der Diagnostik melanozytärer Läsionen

4 Material und Methoden

4.1 Aufbau der Studie

Im Rahmen der Dissertation wurde in kooperativer Zusammenarbeit mit dem Institut für Anatomie II (Zentrum für Lasermikroskopie) der Friedrich-Schiller-Universität Jena sowie der Firma JenLab GmbH (Jena, Deutschland) eine klinische Studie durchgeführt. Im ersten Studienteil (Vorstudie) wurden an 15 Gewebeproben typische Merkmale gesunder Haut, melanozytärer Nävi und Maligner Melanome charakterisiert. Im zweiten Studienteil (Hauptstudie) wurden diese Merkmale an 100 Probanden überprüft und statistisch analysiert. Die während der Hauptstudie durchgeführten MLT-Messungen wurden durch die 20-MHz-Sonographie sowie die digitale Auflichtmikroskopie präoperativ ergänzt.

4.2 Gewebeproben (Vorstudie)

Im Vorfeld der Hauptstudie wurden 15 Gewebeproben melanozytärer Läsionen am Institut für Anatomie II (Zentrum für Lasermikroskopie) der Friedrich-Schiller-Universität Jena mittels MLT untersucht und anschließend histopathologisch an der Universitätshautklinik Jena aufgearbeitet.

4.3 Probandenkollektiv (Hauptstudie)

Die Durchführung der Hauptstudie erfolgte an der Klinik für Dermatologie und dermatologische Allergologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena. In die Studie wurden Patienten mit klinisch auffälligen pigmentierten Hautveränderungen einbezogen. Bestimmte anatomische Regionen (z. B. Augenregion, Genitalregion, Intertrigines) konnten aufgrund der Gerätevorgaben nur *ex vivo* vermessen werden. Weiterhin wurde bei einer fünfjährigen Probandin auf die *in vivo* Datenerhebung verzichtet.

Insgesamt nahmen von September 2003 bis März 2005 einhundert Probanden (55 Männer, 45 Frauen) freiwillig an der Studie teil. Die Probanden waren zwischen 5 und 84 Jahre alt. Das Durchschnittsalter betrug 49 Jahre. Die Altersverteilung ist der Abbildung 7 zu entnehmen.

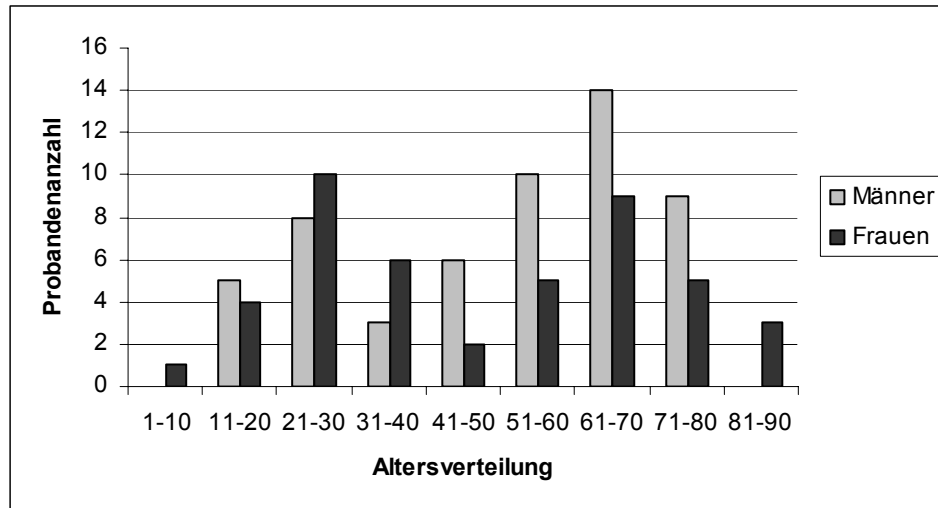


Abb. 7: Altersverteilung der Probanden, absolute Anzahl getrennt nach Männern und Frauen

4.4 Probandenaufklärung

Jeder Proband wurde vor der Untersuchung über die Ziele der Studie, das Verfahren der Multiphotonen-Lasertomographie sowie die damit verbundenen Risiken umfangreich aufgeklärt und erteilte sein Einverständnis in schriftlicher Form. Die Studie entsprach den ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen (Deklaration von Helsinki) und wurde durch die Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena autorisiert. Alle Probanden trafen Ihre Teilnahmeentscheidung aus freien Stücken und wurden darüber informiert, dass sich aus der Teilnahmeablehnung sowie dem Ausscheiden aus der Studie keine Nachteile bezüglich der weiteren medizinischen Behandlung ergeben. Bei den minderjährigen Probanden lag zusätzlich das Einverständnis der Eltern vor.

4.5 Das Lasersystem Dermalnspect

Der in dieser Studie verwendete Multiphotonen-Laser-Tomograph Dermalnspect (JenLab GmbH, Jena, Deutschland) ist ein neu entwickeltes bildgebendes System zur Fluoreszenzdiagnostik der Haut. Es wird entsprechend der aktuellen europäischen Sicherheitsrichtlinien in die Laserschutzklasse 1M eingestuft. Durch intensive Femtosekundenpulse hoher Folgefrequenz im NIR-Spektralbereich kommt es zur Zweiphotonenanregung endogener Fluorophore. Das emittierte Autofluoreszenzlicht wird mit Hilfe hochempfindlicher Detektoren (Photomultiplier) erfasst und

digital verarbeitet. Der Geräteaufbau erlaubt sowohl *in vivo* Untersuchungen an Patienten als auch *ex vivo* Messungen an Gewebeproben. Das Dermalnspect ermöglicht hochaufgelöste Schnittbilder mit subzellulärer Auflösung und hohem Kontrast bis zu einer Gewebetiefe von ca. 200 µm. Zusätzlich unterstützt das System zeitaufgelöste sowie spektrale Analysen des Fluoreszenzlichtes.

Komponenten und Teilsysteme

Das Dermalnspect besteht im Wesentlichen aus 3 Teilsystemen, dem Laser, der Scan-Detektor-Einheit und dem Steuermodul (Abb. 8).



Abb. 8: Lasersystem Dermalnspect mit Laser (1), Scan-Detektor-Einheit (2) und Steuermodul (3) (modifiziert nach JenLab GmbH, www.jenlab.de)

1. Laser

Die kompakte Lasereinheit besteht aus einem durchstimmbaren und gepulsten Titan:Saphir-Laser (MaiTai, Spectra Physics, Mountain View, USA) mit Lasersteuergerät und Chiller.

technische Parameter:	Wellenlängenbereich:	750-850 nm
	Pulsfolgefrequenz:	80 MHz
	Mode:	TEM ₀₀
	Pulsdauer:	< 100 fs
	mittlere Leistung:	> 700 mW

2. Scan-Detektor-Einheit

Die Scan-Detektor-Einheit umfasst eine Photodiode zur Triggerung der Fluoreszenzlebensdauermessung, einen schrittmotorgesteuerten Polarisator zur Leistungsregelung, einen Sicherheitsverschluss und zwei x,y-Galvanometerscanner (Scan-Einheit) zur Strahlablenkung während des Scanvorganges. Weiterhin beinhaltet sie einen Strahlaufweiter, einen Fluoreszenzteiler, eine Fokussieroptik (Objektiv: 40x, NA=1,3/Öl) sowie eine Piezo-z-Höhenverstellung. Die unerwünschte, vom Objekt reflektierte Anregungsstrahlung wird mit Hilfe eines BG39-Filters (Schott AG, Mainz, Deutschland) vor den Detektoren geblockt (Abb. 9).

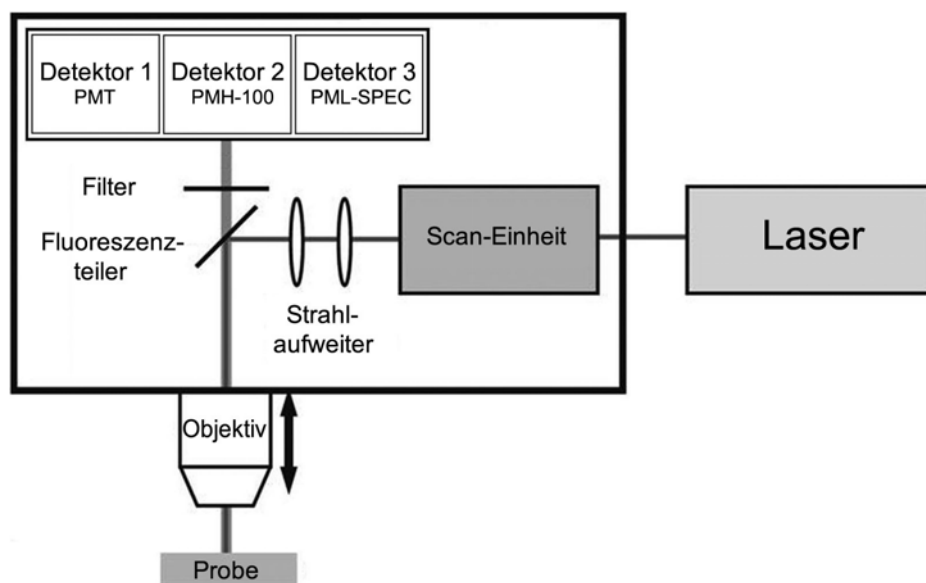


Abb. 9: Vereinfachter schematischer Aufbau der Scan-Detektor-Einheit mit Laser

Strahlengang:

Vom Laser kommend, wird der Strahl durch einen schrittmotorgesteuerten Polarisator entsprechend der gewünschten Anregungsleistung abgeschwächt. Im Weiteren passiert der Strahl die Galvanometerscanner (Scan-Einheit), einen Strahlaufweiter sowie den Fluoreszenzteiler und erreicht schließlich das Objektiv. Nach Anregung der Probe durchläuft das Fluoreszenzlicht retrograd erneut Objektiv und Fluoreszenzteiler, passiert den Filter und wird von den Detektoren erfasst.

3. Steuermodul

Die Steuerung der Scan-Detektor-Einheit erfolgt mit einem System-Steuermodul (JenLab GmbH, Jena, Deutschland). Dieses besteht aus einer Elektronikeinheit und einem Computer. Es übernimmt die Steuerung der Detektoren, der Galvanometerscanner, des Polarisatorschrittmotors sowie der Piezo-z-Höhenverstellung und digitalisiert die analogen Bildsignale. Die Benutzerinteraktion erfolgt dabei über die Steuerungs- und Bildaufnahmesoftware JenLab Scan (JenLab GmbH, Jena, Deutschland).

4.6 Durchführung der MLT-Messung

Messung am Probanden (*in vivo*)

Der Proband wurde auf einer elektrisch verstellbaren Untersuchungsfläche bequem platziert und mit Schaumstoffpolstern stabilisiert. Ein magnetisches Koppelstück mit Glasfenster (Abb. 10) wurde über ein doppelseitiges Klebefeld auf dem Untersuchungsareal befestigt. Zum Angleich der Brechungsindizes wurde zwischen Haut und Glasfenster ein Tropfen Wasser und zwischen Glasfenster und Objektiv ein Tropfen Immersionsöl aufgetragen. Anschließend wurde der Proband mit der Liege an das Gerät gefahren und in die entsprechende Untersuchungsposition gebracht. Nach der magnetischen Ankopplung des Koppelstückes an die Fokussieroptik begann die Messung. Diese fand zur Vermeidung von Fremdlichteinflüssen in einem abgedunkelten Raum statt.

Die Messungen erfolgten, entsprechend der Gewebetiefe (Fokusebene), bei Anregungsleistungen zwischen 5 (Stratum corneum) und 35 mW (Stratum basale). Ausgehend von der Hautoberfläche wurden in vertikalen 10-µm-Schritten Schichtaufnahmen der Epidermis bis zum dermoepidermalen Übergang angefertigt und digital gespeichert. Die Bildaufnahmezeiten (Aquisitionszeiten) wurden dabei so gewählt, dass unter Minimierung der Bewegungsartefakte eine optimale Bildqualität realisiert werden konnte. Die durchschnittliche Untersuchungsdauer betrug 10-15 Minuten. Die verwendeten Edelstahl-Koppelstücke wurden nach jeder Untersuchung vom Einweg-Glasfenster getrennt und desinfiziert.

standardisierte Messparameter (*in vivo*):

Anregungswellenlänge:	760 nm für intraepidermale Messungen 800 nm für selektive Melanin-Messungen 820 nm für intradermale Messungen
Bildaufnahmezeit:	4 s bis 13 s
vertikaler Bildabstand:	10 μm , bei besonderen Fragestellungen <10 μm
Scanfeld:	200 x 200 μm^2
Anregungsleistung:	5 mW bis 35 mW

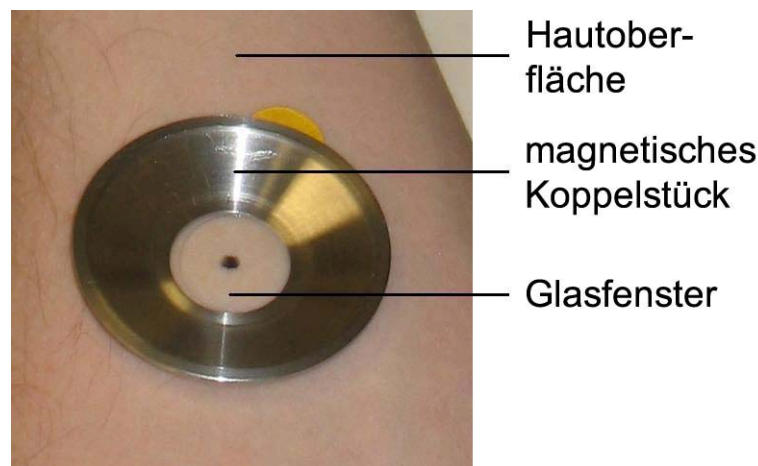


Abb. 10: Koppelstück mit zentralem Glasfenster (Dicke: 0,17 mm) auf einer melanozytären Läsion der Haut

Messung an Gewebeproben (*ex vivo*)

Im Vorfeld der Untersuchung wurde ein in x-, y- und z-Richtung verstellbarer Untersuchungstisch am Gerät befestigt. Innerhalb von 30 Minuten nach operativer Entfernung der Läsionen fand die Nachvermessung statt. Diese erfolgte mit Hilfe einer speziellen Biopsiekammer (MiniCeM, JenLab GmbH, Jena, Deutschland), die das Präparat vor Austrocknung schützte und eine sichere Handhabung gewährleistete (Abb. 11). Der Messvorgang entsprach im Ablauf der *in vivo* Messung. Die nachfolgende histopathologische Aufarbeitung wurde durch die MLT nicht beeinflusst.

standardisierte Messparameter (ex vivo):

Anregungswellenlänge:	760 nm für intraepidermale Messungen 800 nm für selektive Melanin-Messungen 820 nm für intradermale Messungen
Bildaufnahmezeit:	13 s, bei besonderen Fragestellungen <13 s
vertikaler Bildabstand:	10 μm , bei besonderen Fragestellungen <10 μm
Scanfeld:	200 x 200 μm^2
Anregungsleistung:	5 mW bis 50 mW

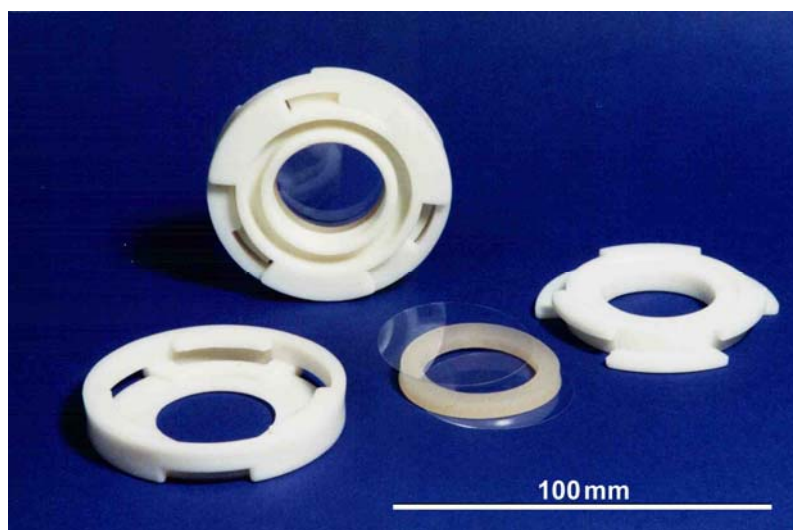


Abb. 11: Biopsiekammer mit Silikonring und Deckgläschen (modifiziert nach JenLab GmbH, www.jenlab.de)

4.7 Detektionsverfahren

Messung der Fluoreszenzintensität

Detektor: PMT (Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan)

MLT-Schnittbilder entsprechen grauwertcodierten Darstellungen der gemessenen Fluoreszenzintensität innerhalb der Focusebene. Intensiv fluoreszierende (hyperintense) Areale erscheinen hell, wohingegen nicht fluoreszierende (hypointense) Bereiche sich dunkel darstellen. Die Messung der Fluoreszenzintensität beruht auf der Detektion von emittierten Fluoreszenzphotonen. Dabei kommen hochempfindliche Empfänger (Photomultiplier) zum Einsatz. Diese wandeln die schwache Emissionsstrahlung in ein elektrisches Signal.

Ein Photomultiplier (PMT) besteht aus einer Photokathode und einer Anode. Zwischen diesen befinden sich ein elektrisches Feld sowie verschiedene Dynoden (Metallflächen). Trifft ein Photon entsprechender Energie auf die Kathode, so wird dort ein Photo-Elektron ausgeschlagen (Photoelektrischer Effekt) und durch das elektrische Feld in Richtung Anode beschleunigt. Dieses Primärelektron kollidiert auf seinem Weg zur Anode mit den Dynoden, aus denen es Sekundärelektronen ausschlägt. Dies hat zur Folge, dass pro Primärelektron 10^5 - 10^7 Sekundärelektronen erzeugt werden. Das so verstärkte elektrische Signal wird an der Anode abgenommen (Abb. 12).

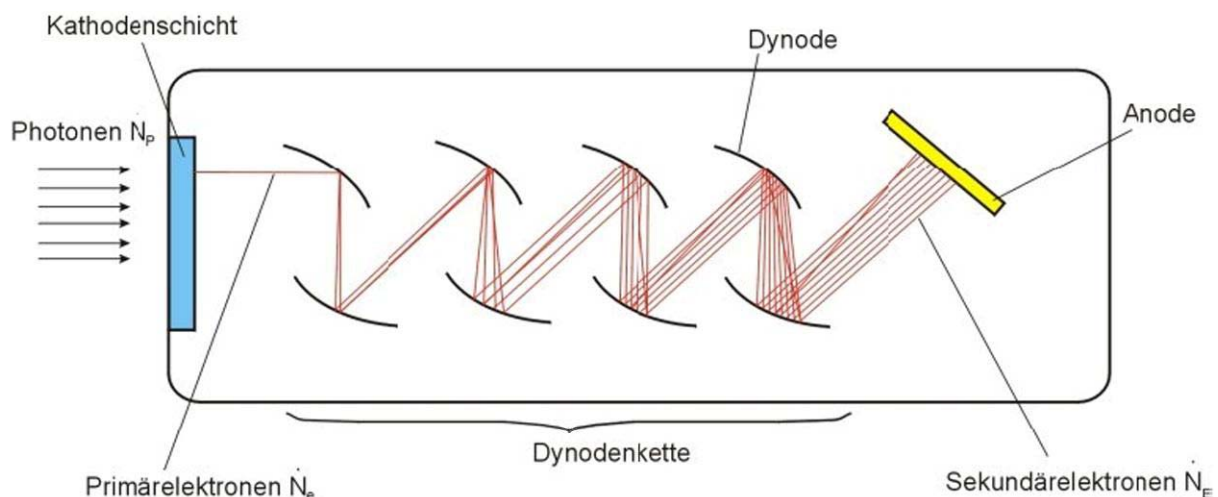


Abb. 12: Aufbau eines PMT (modifiziert nach Andreas Dreizler, TU-Darmstadt)

Messung der Fluoreszenzabklingzeiten

Detektor: PMH-100 (Becker&Hickl, Berlin, Deutschland)

Die Messung der Fluoreszenzabklingzeiten (FLIM: fluorescence lifetime imaging) erfolgt nach dem Prinzip der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung. Dabei wird die Probe mit Femtosekunden-Laserpulsen angeregt. Von jedem Anregungspuls wird ein Fluoreszenzvorgang ausgelöst, der mit einer spezifischen Zeit abklingt. Die dabei emittierten Photonen werden im zeitlichen Verlauf zum Anregungspuls durch einen SPC (single photon counting)-Detektor erfasst und von einem TCSPC (time correlated single photon counting)-Modul (SPC-830, Becker&Hickl, Berlin, Deutschland) gespeichert. Für jeden Pixel des vermessenen Areal wird die statistische Verteilung der Emissionszeiten in einem Histogramm in Form der Fluoreszenzabklingkurve dargestellt (Abb. 13). Mit Hilfe einer biexponentiellen Annäherungsgleichung konnten daraus die Fluoreszenzlebensdauern (τ_1 , τ_2) sowie ihre jeweiligen Amplituden (a_1 , a_2), die relativen Anteile am Gesamtsignal, berechnet werden (siehe Kap. 2.6).

Durch eine Falschfarbendarstellung der gemittelten Abklingzeiten aller Pixel des Untersuchungsareals konnte eine schnelle Beurteilung der läsionstypischen Abklingkinetik realisiert werden. Die Farbcodierung erfolgte im Bereich von -250 ps (rot) bis 1250 ps (blau). Alle im Rahmen dieses Messverfahrens durchgeführten Datenverarbeitungsprozesse erfolgten über die Software SPCImage (Becker&Hickl, Berlin, Deutschland). Die TCSPC Messung erforderte im Vergleich zur Intensitätsmessung eine längere Bildaufnahmezeit. Zur Vermeidung von Strahlungsschäden am Gewebe (Photobleaching) wurden daher bis zu 20 sequentielle Scans mit kurzen Bildaufnahmezeiten (7s) während einer Messung hintereinander durchgeführt.

Der SPC-Detektor besitzt im Unterschied zum PMT-Detektor eine bessere zeitliche Auflösung (<200 ps) und ermöglicht dadurch, zusätzlich zur Intensitätsmessung, Aussagen zum Fluoreszenzabklingverhalten der Probe.

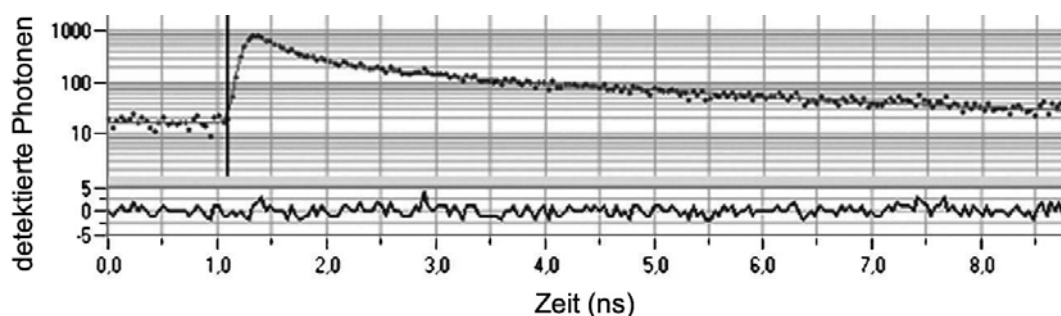


Abb. 13: Histogramm einer zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (Fluoreszenzabklingkurve)

Messung der Emissionsspektren

Detektor: PML-SPEC (Becker&Hickl, Berlin, Deutschland)

Bei diesem Verfahren wird das Fluoreszenzlicht vor dem Detektor mit Hilfe eines Polychromators auf 16 spektrale Kanäle verteilt. Für jeden Kanal können die Fluoreszenzintensität sowie das Fluoreszenzabklingverhalten der Probe durch einen 16-Kanal-Multi-Anoden-PMT (PML-16, Becker&Hickl, Berlin, Deutschland) einzeln bestimmt werden. Derart ist eine simultane Erhebung von spektral- und zeitaufgelösten Fluoreszenzdaten möglich. Jedes detektierte Photon wird zusammen mit einem Zeitsignal und der Nummer des spektralen Kanals an das TCSPC Modul (SPC-830, Becker&Hickl, Berlin, Deutschland) übertragen. Dieses Modul ermöglicht eine vierdimensionale Darstellung der Photonenverteilung über die Emissionswellenlänge, das Fluoreszenzabklingverhalten und die Koordinaten innerhalb des Untersuchungsareals (Becker et al. 2007). Zur Visualisierung der Emissionsspektren wurde die für jeden Kanal gemessene Photonenzahl aus dem TCSPC-Modul ausgelesen, in eine Tabellenkalkulationssoftware (EXCEL, Microsoft Corporation, Redmond, USA) importiert und grafisch dargestellt (vgl. Abb. 14). Alle gemessenen Fluoreszenzspektren wurden entsprechend der unterschiedlichen Detektorkanalsensitivitäten korrigiert.

Aufgrund der geringen Fluoreszenzquantenausbeute (Signalstärke) pro Kanal musste die Aquisitionszeit entsprechend lang (>3 Minuten) gewählt werden. Dadurch bedingte natürliche Bewegungsartefakte beschränkten die Anwendbarkeit dieses Verfahrens auf *ex vivo* Messungen.

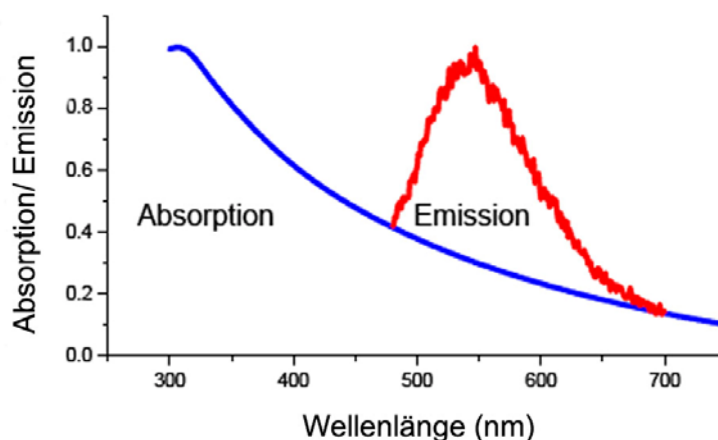


Abb. 14: Absorptions- und Emissionsspektrum von Melanin in DMSO (modifiziert nach Colbert et al., 2005)

4.8 Korrelation der MLT-Bilddaten

Die histopathologische Aufarbeitung der im Rahmen der Studie entnommenen Hautveränderungen ermöglichte zum einen die sichere diagnostische Einordnung der Läsion und zum anderen die Zuordnung und den Vergleich morphologischer Strukturen in beiden Verfahren. Da sowohl bei der Histopathologie als auch bei der Lasertomographie Schnittbilder mit subzellulärer Auflösung entstehen, konnten zelluläre wie extrazelluläre Strukturen auf gleichem Niveau miteinander verglichen werden. Aufgrund technischer Vorgaben konnten *in vivo* MLT-Schnittbilder nur in der horizontalen Ebene erstellt werden. Zur besseren Korrelation mit histopathologischen Merkmalen wurden daher sowohl horizontale als auch vertikale Schnittbilder bei beiden Verfahren an Gewebeproben (*ex vivo*) angefertigt (Abb. 15).

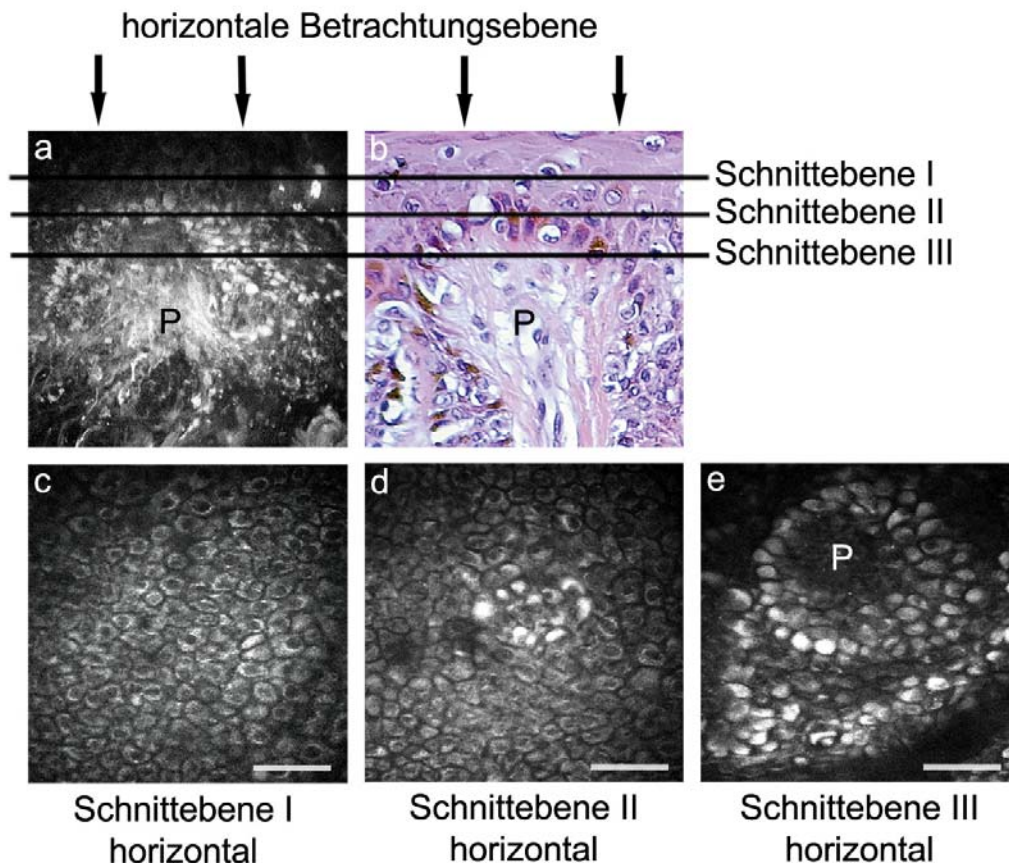


Abb. 15: Gegenüberstellung eines vertikalen MLT- (a) und HE-gefärbten Histologie-Schnittbildes (b) einer melanozytären Läsion mit korrespondierenden horizontalen MLT-Darstellungen aus unterschiedlichen Gewebetiefen (c, d, e). Die einzelnen Schnittebenen (schwarze Linien) symbolisieren die Fokusebene der entsprechenden horizontalen MLT-Aufnahme, c: Stratum spinosum/basale, d: Stratum basale mit stark fluoreszierenden pigmentierten Zellen und e: angeschnittene fluoreszenzarme dermale Papille (P) mit peripapillären pigmentierten Zellen des Stratum basale. $\lambda_{\text{ex}}=760 \text{ nm}$, Messbalken: $40 \mu\text{m}$

Histologische Färbungen

Die histologische Aufarbeitung der Gewebeproben erfolgte standardisiert durch die Abteilung für Dermatohistopathologie der Universitätshautklinik Jena. Alle Präparate wurden nach der Paraffineinbettung microtomgeschnitten und Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Zur selektiven Darstellung einzelner Zellarten kamen verschiedene immunhistochemische Färbetechniken (S100, Melan A, CD1a) zum Einsatz (Abb. 16). Derart konnten histologisch und fluoreszenzoptisch sichtbare Strukturen miteinander verglichen werden.

Hämatoxylin-Eosin (HE)

Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum und färbt alle sauren (basophilen) Strukturen blau (z. B. DNA, Zellkern, rauhes endoplasmatisches Retikulum). Eosin als synthetischer Farbstoff färbt alle basischen (acetophilen) Strukturen rot. Die HE-Färbung dient als Übersichtsfärbung.

S100

S100 ist ein in zahlreichen Zellen vorkommendes Protein. Es findet als sehr sensitiver aber wenig spezifischer Melanommarker Verwendung. Innerhalb der Epidermis färbt es sowohl die Melanozyten als auch die Langerhans-Zellen rot.

Melan A

Melan A ist ein gewebespezifisches Antigen, welches ausschließlich in Melanozyten exprimiert wird und daher zur Differenzierung herangezogen werden kann.

CD1a

Die CD1a-Färbung weist das CD1a-Antigen an der Oberfläche von Langerhans-Zellen, kortikalen Thymozyten sowie dendritischen und interdigitierenden Retikulumzellen nach.

Von besonderer Bedeutung bei allen Spezialfärbungen war die Verteilung und Morphologie der intraepidermalen dendritischen Zellen. Zu diesen gehören neben den pigmentbildenden Melanozyten auch die immunaktiven und antigen-präsentierenden Langerhans-Zellen.

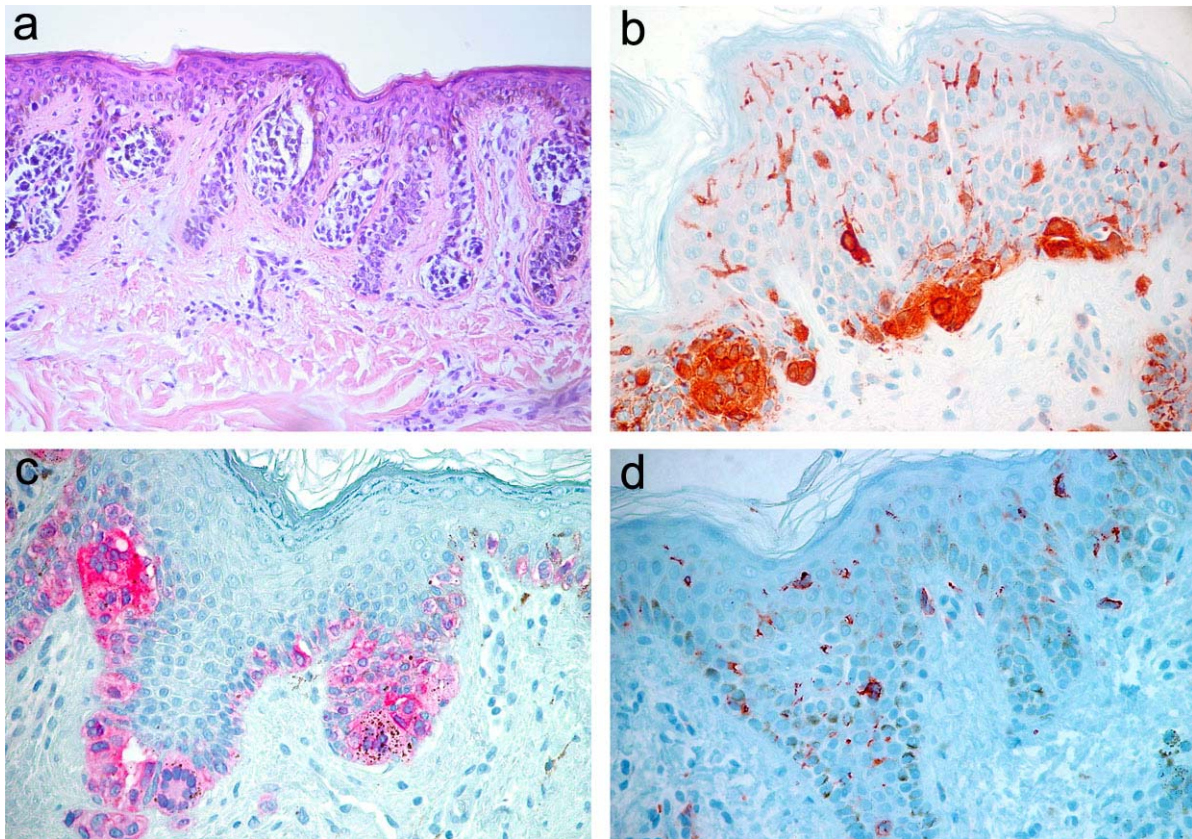


Abb. 16: Histologische Schnittbilder melanozytärer Nävi mit verschiedenen Färbetechniken. a: HE-Übersichtsfärbung, b: S100-Färbung mit rot markierten Melanozyten und Langerhans-Zellen, c: Melan A-selektive Färbung der Melanozyten (rot) und d: CD1a-selektive Färbung der Langerhans-Zellen (rot), (b,c,d: 400 fache Vergrößerung)

4.9 Datenauswertung

Die in der Vorstudie charakterisierten Differenzierungsmerkmale des Malignen Melanoms wurden im Rahmen der Hauptstudie an 100 weiteren melanozytären Läsionen überprüft. Dazu wurden alle MLT-Bilddaten der Hauptstudie von 4 unabhängigen Ärzten der Universitätshautklinik bewertet. Die dabei favorisierten Diagnosen wurden anschließend mit den histopathologischen Befunden verglichen und statistisch analysiert.

Trainingsdaten

Drei unabhängige, dermatologisch tätige Ärzte (1 Fachärztin, 2 Assistenzärzte) sowie der studienleitende Arzt wurden in die Bildbeurteilung einbezogen. Um den beteiligten Ärzten ein einheitliches Hintergrundwissen über die MLT zu vermitteln, erfolgte eine strukturierte einstündige Einweisung durch den Studienleiter. Dabei wurden die Kollegen mit dem Prinzip der Bildentstehung, den Besonderheiten des Verfahrens und der systematischen Bildanalyse vertraut gemacht. Die morphologisch

sichtbaren Strukturen wurden an typischen Bildbeispielen gesunder Haut, melanozytärer Nävi und Maligner Melanome gezeigt und erörtert.

Bildanalyse und Beurteilung

Die Bildbeurteilung verlief anonymisiert und verblindet. Den Ärzten standen keine weiteren klinischen Informationen zu Verfügung. Jeder Arzt hatte die Messdaten von 100 Probanden mit insgesamt ca. 5000 Schnittbildern systematisch zu bewerten. Dabei sollte nicht nur das Auftreten der einzelnen Differenzierungsmerkmale überprüft, sondern auch eine Klassifizierung bezüglich der Malignität der jeweiligen Läsion vorgenommen werden.

Statistische Kennwerte

Im Rahmen der Auswertung erfolgte die Berechnung von statistischen Kennwerten. Dazu zählten die Sensitivität (Wahrscheinlichkeit eines positiven Testbefundes bei erkrankten Personen), die Spezifität (Wahrscheinlichkeit eines negativen Testbefundes bei nicht erkrankten Personen) sowie der positive Vorhersagewert (Wahrscheinlichkeit, dass die Person bei positivem Testbefund erkrankt ist) und der negative Vorhersagewert (Wahrscheinlichkeit, dass die Person bei negativem Testbefund nicht erkrankt ist).

Logistische Regressionsanalyse

Mit Hilfe der binären logistischen Regressionsanalyse (Rückwärtsverfahren nach Wald) untersuchten wir die Abhängigkeit der Diagnose Malignes Melanom von den einzelnen Differenzierungsmerkmalen. Dabei wurden schrittweise die Kriterien entfernt, die keinen signifikanten Einfluss ($p\text{-Wert} > 0,10$) auf die Diagnose hatten. Die Signifikanzprüfung erfolgte mit Hilfe der Software SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA).

Kappa (κ)-Statistik

Zur Überprüfung der Güte der Urteilsübereinstimmung zwischen den Ärzten (interobserver agreement) wurde das Übereinstimmungsmaß nach Fleiss (Fleiss' Kappa) ermittelt. Dabei nimmt Kappa (κ) Werte zwischen 0 (keine Übereinstimmung) und 1 (völlige Übereinstimmung) an. Die Interpretation der Kappa-Werte wurde, in Anlehnung an Landis und Koch (1977), anhand folgender Unterteilung durchgeführt: $\kappa \leq 0,4$ schlechte Übereinstimmung, $\kappa \geq 0,41$ mittelgradige Übereinstimmung, $\kappa \geq 0,61$ gute Übereinstimmung, $\kappa \geq 0,81$ exzellente Übereinstimmung.

5 Ergebnisse

5.1 Messung der Fluoreszenzintensität

Sichtbare Fluoreszenzstrukturen im histologischen Vergleich

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel. Sie besteht zu etwa 90% aus Keratinozyten, die sich in Korneozyten (Hornzellen) umwandeln. Diese Zellen bilden nach außen die Hornschicht. Neben den als Keratinozyten bezeichneten Epithelzellen im engeren Sinne finden sich bis zu 10% Zellen, die für einzelne Aufgabenbereiche spezialisiert sind. Dazu zählen Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen (siehe Kap. 2.1).

Die Identifizierung der einzelnen, in den Fluoreszenzintensitätsmessungen zur Darstellung kommenden Strukturen, erfolgte durch den direkten Vergleich mit horizontal geschnittenen histologischen Dünnschichtpräparaten. Dabei zeigte sich eine gute Übereinstimmung der architektonischen wie zellulären Strukturen. Abbildung 17 verdeutlicht die einheitliche Morphologie epidermaler Keratinozyten in beiden Verfahren. Es fällt auf, dass sich in den Fluoreszenzabbildungen die Zellkörper, insbesondere in Kernnähe, mit hohem Kontrast abzeichnen. Die Zellgrenzen kommen nur indirekt zur Darstellung. Intrazelluläre stoffwechselaktive Organellen werden durch hyperintense Fluoreszenzareale repräsentiert. Die häufig im Stratum granulosum in Erscheinung tretenden „Doppelkerne“ (Abb. 17a) sind am ehesten auf einen doppelten Anschnitt der abgeflachten und sich in Auflösung befindenden Zellkerne, innerhalb der Fokusebene zurückzuführen. Im Unterschied zur Histologie zeigt sich der Kern homogen fluoreszenzarm, ohne Kernkörperchen.

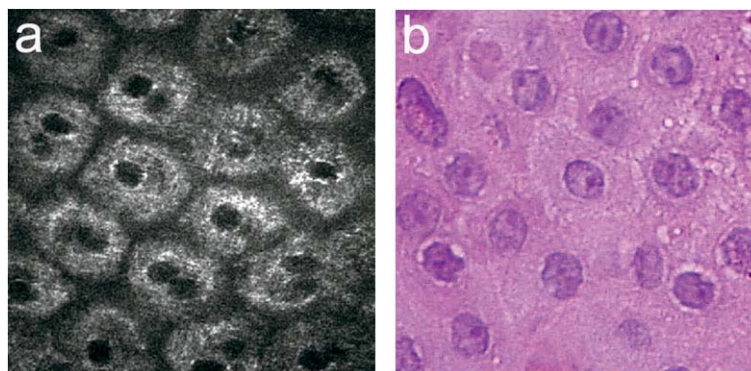


Abb. 17: Horizontale Schnittbilder gesunder Haut im Bereich des Stratum granulosum, erstellt mittels MLT (a) und histopathologischer Durchlichtmikroskopie (b). a: $\lambda_{\text{ex}}=760$ nm, b: HE-Färbung

Abbildung 18 zeigt korrespondierende Strukturen eines melanozytären Nävus im Bereich der dermoepidermalen Junktionszone. In beiden Abbildungen finden sich horizontal angeschnittene dermale Bindegewebpapillen (P) mit angrenzenden basalen Keratinozyten und pigmentbildenden Melanozyten. Im Vergleich zur Abbildung 17 ist der Zelldurchmesser deutlich reduziert. Das intrapapilläre Bindegewebe stellt sich fluoreszenzarm dar. Ein gehäuftes Auftreten von pigmentierten Zellen im Randbereich der Papillen zeigt sich sowohl bei der mikroskopischen Aufnahme (Abb. 18b) als auch in der lasertomographischen Darstellung (Abb. 18a).

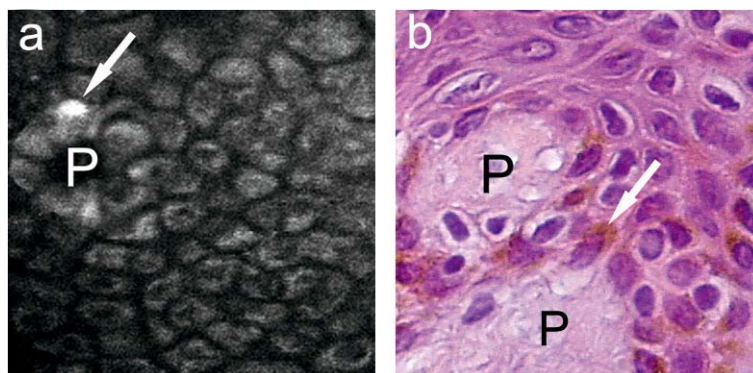


Abb. 18: Horizontale Schnittbilder einer melanozytären Läsion im Bereich der dermoepidermalen Junktionszone mit angeschnittenen Papillen (P) und peripapillären, teils stark pigmentierten Zellen (Pfeile), erstellt mittels MLT (a) und histopathologischer Durchlichtmikroskopie (b). a: $\lambda_{\text{ex}}=760$ nm, b: HE-Färbung

Ergänzend wurden vertikale MLT-Aufnahmen (Abb. 19a) mit konventionellen Histologieschnitten (Abb. 19b) verglichen. Auch dabei zeigte sich eine gute Übereinstimmung architektonischer wie zellulärer Strukturen.

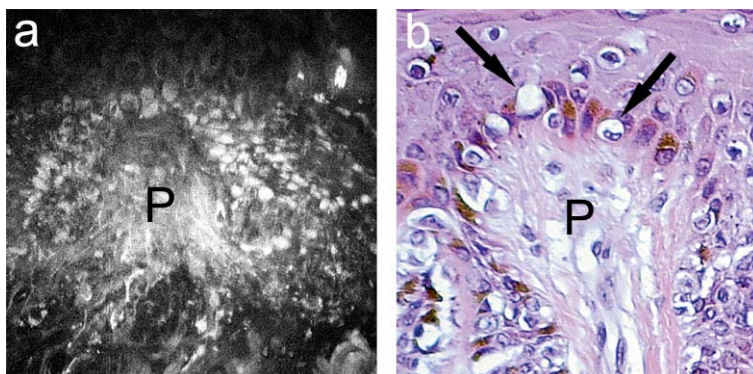


Abb. 19: Vertikaler Anschnitt einer dermalen Bindegewebspapille (P) eines melanozytären Nävus mit peripapillären Keratinozyten und Melanozyten (Pfeile), erstellt mittels MLT (a) sowie histopathologischer Durchlichtmikroskopie (b). a: $\lambda_{\text{ex}}=760$ nm, b: HE-Färbung

Zelluläre Fluoreszenz

Keratinocyten

Die Keratinocyten dominieren innerhalb der Epidermis das Zellbild. Ihr horizontaler Durchmesser nimmt infolge der Differenzierung vom Stratum basale zum Stratum granulosum kontinuierlich zu. Die Zellen verarmen an Zellorganellen, zeigen eine Degeneration des Zellkerns und werden zunehmend flacher, je weiter sie innerhalb der Epidermis aufsteigen. In den Fluoreszenzintensitätsdarstellungen zeigten sie eine ausgeprägte Autofluoreszenz, die vorrangig durch zytoplasmatische, NAD(P)H-reiche Zellorganellen (Mitochondrien) sowie Keratohyalin granula verursacht wurde (Abb. 17a). Der Zellkern und die Zellgrenzen stellten sich aufgrund fehlender Fluorophore nur indirekt, hypointens dar. Bei intensiver Melaninanreicherung können Keratinocyten als homogen und hyperintens fluoreszierende Zellen imponieren. Bedingt durch intrazelluläre Melaninabbauprozesse während der transepidermalen Migration fanden sich hyperintense Keratinocyten vorrangig in basalen Epidermischichten.

Korneocyten

Hierbei handelt es sich um tote und kernlose Zellrümpfe der Epidermisoberfläche. Aufgrund der intrazellulären Keratinanreicherung, des Verlustes der Zellorganellen und der Verdickung der Zellmembran zeigten die Korneocyten, anders als die Keratinocyten, eine intensive und homogene Fluoreszenz. Die polygonalen Zellrümpfe kamen häufig randbetont zur Darstellung (Abb. 22a). Bereits geringe Anregungsleistungen (<10 mW) führten zu einer hohen Fluoreszenzintensität. Hautfalten und Abschürfungen manifestierten sich in unregelmäßigen Fluoreszenzmustern (Abb. 22b).

Melanozyten

In HE-gefärbten Histologieschnittbildern treten die Melanozyten als helle Zellen mit rundem, basophilen Kern in Erscheinung (Abb. 19b). In den Fluoreszenzintensitätsdarstellungen kamen sie ähnlich den pigmentierten Keratinocyten, als kleine, homogen und hyperintens fluoreszierende Zellen zur Darstellung. Durch angeschnittene randständige Kerne fand sich häufig das Bild einer sichelartigen Zellform. Vereinzelt konnten dendritische Zellfortsätze nachgewiesen werden.

Merkel-Zellen

Merkel-Zellen sind langsam adaptierende Mechanorezeptoren, die auf statische und dynamische Reize sowie Vibration reagieren. Sie finden sich einzeln oder in Gruppen zwischen den Basalzellen der Oberhaut. Eine sichere histologische Klassifizierung erfordert immunhistochemische Spezialfärbungen. In den lasertomographischen Messungen konnten diese Zellen bisher nicht dargestellt werden.

Langerhans-Zellen

Bei den Langerhans-Zellen handelt es sich um antigenpräsentierende Zellen des Immunsystems, die dem Knochenmark entstammen und in die Haut einwandern. Ihr Anteil an den Epidermiszellen beträgt 2-8% (im Mittel etwa 450/mm²) (Junqueira et al. 2004). Lichtmikroskopisch sind Sie nur durch immunhistochemische Spezialfärbungen sicher zu differenzieren (Abb. 16d). Die histopathologisch, vorrangig im Stratum spinosum, nachweisbaren dendritischen Zellen konnten lasertomographisch bisher nicht abgebildet werden.

Extrazelluläre Fluoreszenz

Extrazelluläre Fluoreszenzstrukturen fanden sich vorrangig innerhalb der Dermis in Form von elastischen und kollagenen Fasern, die bei konventionellen Intensitäts-Messungen ($\lambda_{\text{ex}}=760$ nm) häufig nur indirekt, als hypointense dermale Papillen, zur Darstellung kamen (Abb. 18a). Die direkte Visualisierung erfordert spezielle Anregungsparameter (Abb. 20). Während das Elastinsignal sich auf multiphotonen-angeregte Fluoreszenz zurückführen lässt, geht das Kollagensignal vorrangig von SHG-Effekten (siehe Kap. 2.7) aus (Zoumi et al. 2002).

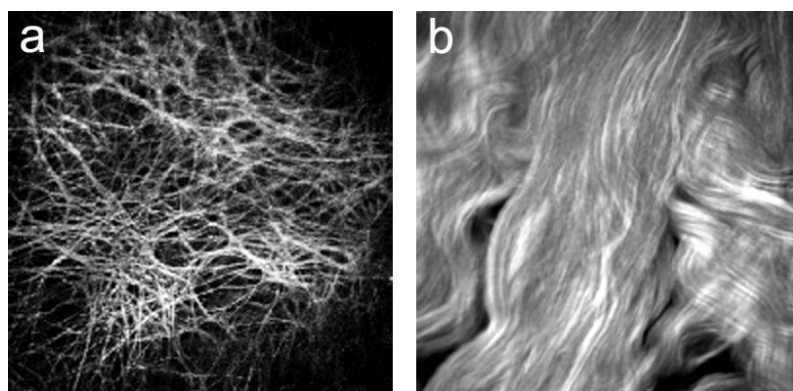
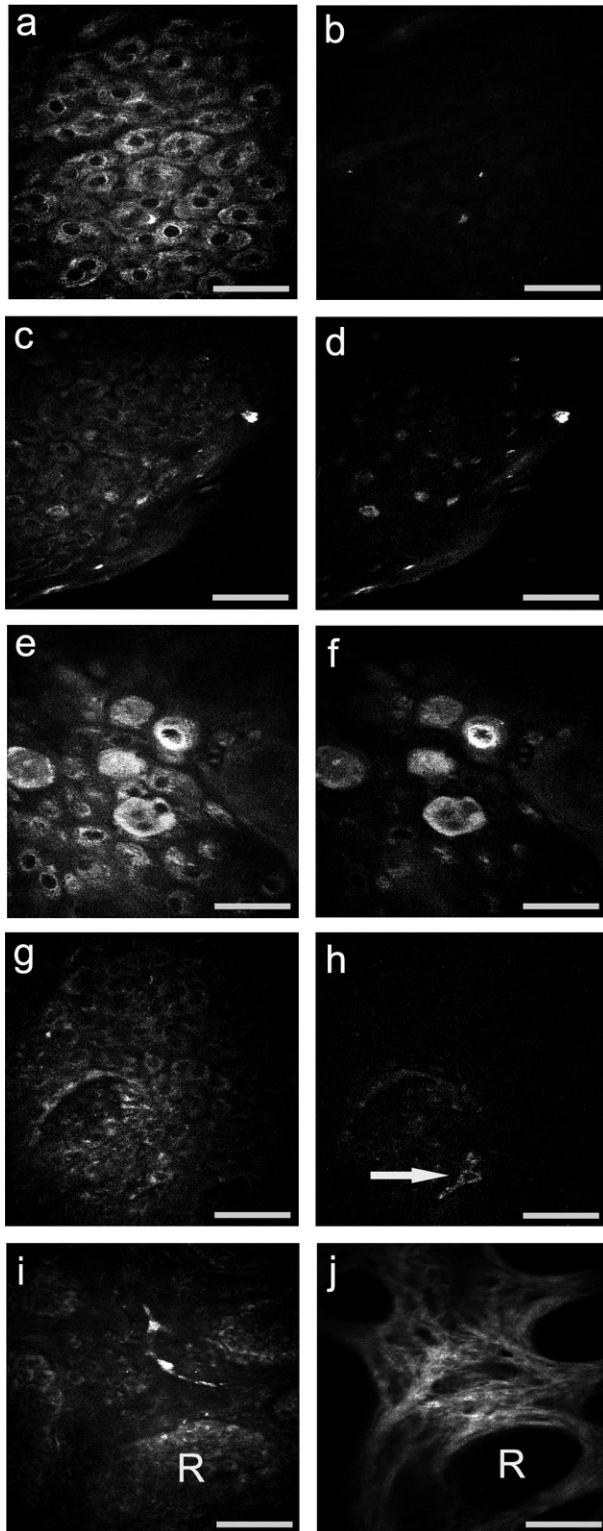


Abb. 20: Multiphotonenangeregte Darstellung von Elastin (a) und Kollagen (b) an Gewebeprobe. a: $\lambda_{\text{ex}} \geq 750$ nm, b: $\lambda_{\text{ex}} \geq 800$ nm

5.2 Selektive Fluoreszenzanregung

Das besondere Lichtabsorptionsverhalten des Melanins, mit einem vom nahen UV- bis zum NIR-Spektralbereich monoton fallenden Absorptionsspektrum erlaubte eine Anregung mit 760 nm sowie mit 800 nm und unterscheidet sich grundlegend von den



häufig durch diskrete Absorptionsbanden gekennzeichneten Spektren anderer Hautfluorophore (Teuchner et al. 2000, 2003). Die daraus resultierende selektive Anregbarkeit gegenüber anderen epidermalen Strukturen soll im Folgenden veranschaulicht werden. Abbildung 21 zeigt vergleichende Darstellungen derselben Fokusebene mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen (links: 760 nm, rechts: 800 nm). In den Abbildungen b und d findet sich gegenüber den Abbildungen a und c ein fast gänzlich unterdrücktes keratinozytäres Fluoreszenzmuster mit deutlich zur Darstellung kommenden melaninhaltigen Zellen (d). Die Abbildungen e und f zeigen bei beiden Anregungswellenlängen pleomorphe Melanozyten eines Malignen Melanoms. Ein Melanozyt mit dendritischen Zellfortsätzen grenzt sich in Abbildung h vom basalen Zellverband (g) ab.

Auch bindegewebige Strukturen des Stratum papillare (j) lassen sich selektiv mit $\lambda_{\text{ex}} \geq 800$ nm anregen und grenzen sich deutlich von den basalen Keratinozyten (i) ab.

Abb. 21: Korrespondierende MLT-Schnittbilder mit $\lambda_{\text{ex}}=760$ nm (a, c, e, g, i) und $\lambda_{\text{ex}}=800$ nm (b, d, f, h, j) aus unterschiedlichen Läsionen. weißer Pfeil: dendritische Zelle, R: Reteleiste, Messbalken: 40 μm

5.3 MLT-Merkmale gesunder Haut

Die Multiphotonen-Lasertomographie ermöglicht die nichtinvasive Beurteilung epidermaler und dermaler Hautstrukturen anhand hochaufgelöster, horizontaler Gewebeschnittbilder.

Abbildung 22a zeigt das charakteristische Erscheinungsbild der kernlosen und randbetont fluoreszierenden, polygonalen Korneozyten, die einzeln abgrenzbar oder als unregelmäßig fluoreszierender Zellverband mit hypo- und hyperintensiven Arealen zur Darstellung kamen (Abb. 22b). Der mittlere horizontale Zelldurchmesser wurde innerhalb der Hornzellschicht mit $42 \pm 5 \mu\text{m}$ ermittelt. Hauptträger der korneozytären Fluoreszenz ist das intrazellulär konzentrierte Keratin (Pena et al. 2005). Etwa 10-20 μm unterhalb der Hautoberfläche fand sich die Körnerzellschicht. Diese war durch einen regelmäßigen Verband ovaler Zellen mit perinukleärer Anreicherung granulär fluoreszierender Zellorganellen gekennzeichnet (Abb. 22c). Die Interzellularräume kamen ebenso wie die Zellgrenzen bzw. der Zellkern nur indirekt, als fluoreszenzarme Areale, zur Darstellung. Die Keratinozyten zeigten ein monomorphes Erscheinungsbild, mit einem horizontalen Zelldurchmesser von $35 \pm 4 \mu\text{m}$. An die Körnerzellschicht grenzte die darunter liegende Stachelzellschicht mit polygonalen und regelmäßig angeordneten Einzelzellen (horizontaler Durchmesser: $22 \pm 4 \mu\text{m}$). Trotz der hohen Zelldichte bildeten sich die keratinozytären Zellkörper deutlich ab (Abb. 22d). In einer Tiefe von 50-100 μm fand sich die Basalzellschicht (Abb. 22e). Hier hatten die Keratinozyten ihren kleinsten Horizontaldurchmesser von durchschnittlich $8 \pm 2 \mu\text{m}$. Der regelmäßige und dichte Zellverband war durch kleine, polygonale Einzelzellen charakterisiert.

Das Fluoreszenzbild der Basalzellschicht wurde mit zunehmender Gewebetiefe von hypointensen Bindegewebspapillen der Dermis unterbrochen. Diese imponierten als unregelmäßig begrenzte und fluoreszenzarme Areale (Abb. 22f).

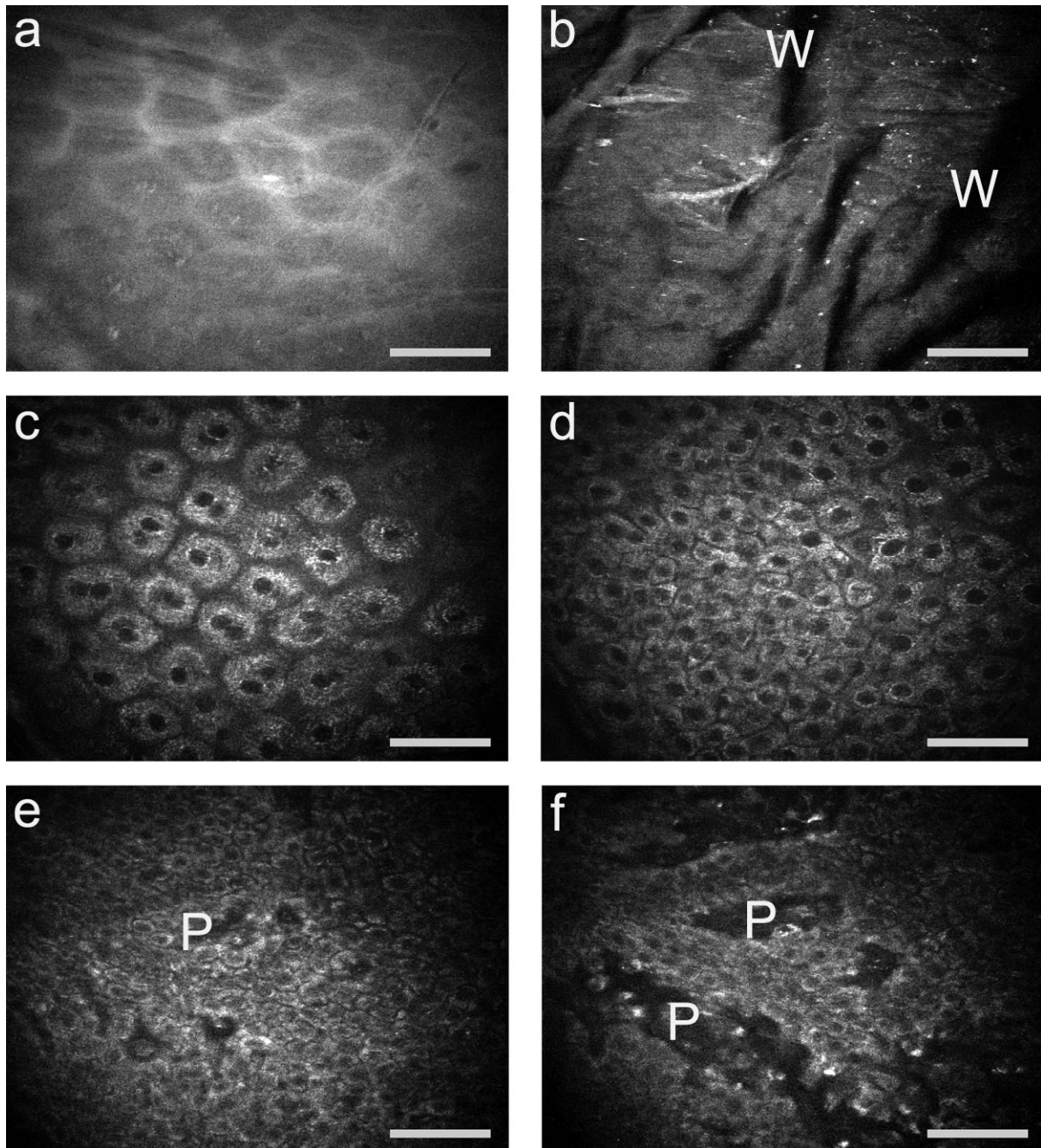


Abb. 22: Horizontale MLT-Schnittbilder gesunder Haut in unterschiedlichen Gewebetiefen (a, b: Stratum corneum, c: Stratum granulosum, d: Stratum spinosum, e: Stratum basale, f: dermoepidermale Übergangszone). W: Hautfalten, P: dermale Bindegewebspapillen, $\lambda_{\text{ex}}=760 \text{ nm}$, Messbalken: $40 \mu\text{m}$

5.4 MLT-Merkmale melanozytärer Nävi

Die im Rahmen der Studie untersuchten melanozytären Nävi umfassten die Gruppe der Junctionsnävi, Compoundnävi, dermalen Nävi, der Nävus bleu und der Spitz-Nävi. In den oberen Epidermisschichten fanden sich, bis auf seltene Pigmentunregelmäßigkeiten, keine markanten Unterschiede im Vergleich zur

gesunden Haut. Als charakteristisches Merkmal aller pigmentierten Nävi zeigten sich zahlreiche hyperintens fluoreszierende Einzelzellen sowie Zellnester, vorrangig im Bereich der Basalzellschicht (Abb. 23) (Huang et al. 2006). Diese Zellen waren gekennzeichnet durch einen hohen intrazellulären Melaningehalt. Im Unterschied zu anderen epidermalen Fluorophoren konnte Melanin auch mit Wellenlängen ≥ 800 nm effizient angeregt werden (Hoffmann et al. 2001, Teuchner et al. 2003). Der Zellkern kam häufig nicht oder nur randständig zur Darstellung (Abb. 23a). Die monomorphen, gut abgrenzbaren Melanozyten lagen in einem regelmäßigen Zellverband vor. In Übereinstimmung zur konventionellen Histopathologie fand sich eine läsionstypische Verteilung der Zellnester. So zeigten sich diese beim Junktionsnävus innerhalb des Stratum basale und beim Compound Nävus zusätzlich im Bereich der Papillenspitzen.

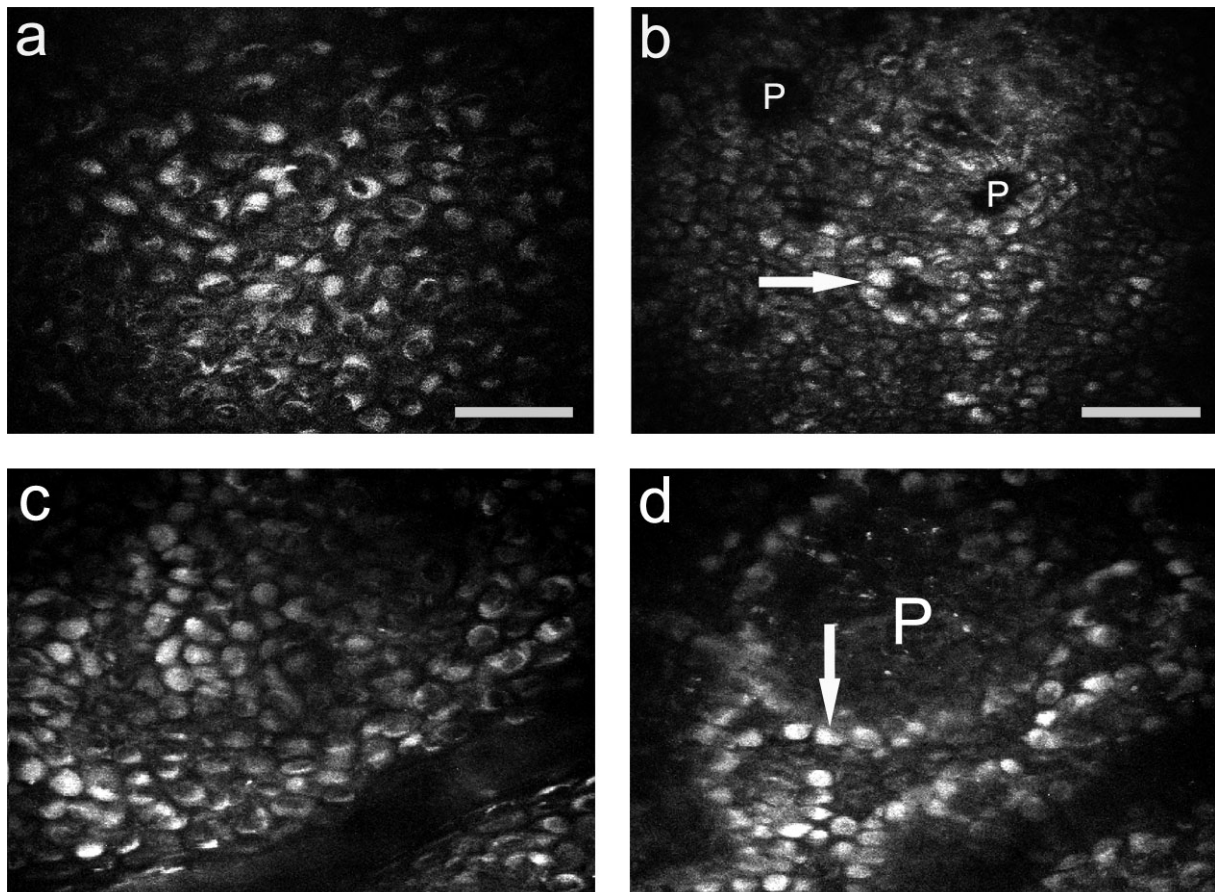


Abb. 23: Horizontale MLT-Schnittbilder melanozytärer Nävi im Bereich der dermoepidermalen Junktionszone mit zahlreichen, zum Teil sichelförmigen, hyperintensiven Zellen (a), häufig in peripapillärer Anordnung (b, d: Pfeile) oder in Form melanozytärer Zellnester (c). P: dermale Bindegewebspapillen, $\lambda_{\text{ex}}=760$ nm, Messbalken: 40 μm

5.5 MLT-Merkmale Maligner Melanome

Bei den Malignen Melanomen fanden sich ausgeprägte morphologische Veränderungen im Vergleich zu melanozytären Nävi und gesunder Haut. Abbildung 24a zeigt eindrucksvoll hyperintense Ringstrukturen innerhalb der homogen flächigen Fluoreszenz der Hornzellschicht. Dabei handelt es sich um melaninhaltige Zellen, die auch in histopathologischen Dünnschichtpräparaten als transepidermal migrierende Melanozyten in Erscheinung traten. In den darunter liegenden Epidermisschichten zeigten sich deutliche Veränderungen der Zyto- und Histoarchitektur. In der Körner- und Stachelzellschicht kamen große interzelluläre Abstände, unscharfe Zellgrenzen sowie fluoreszenzarme Keratinozyten zur Darstellung (Abb. 24b,c,d). Der Zellverband erschien aufgelockert und lückenhaft. Zellfragmente und atypisch pleomorphe Melanozyten fanden sich in allen epidermalen Schichten, vorwiegend jedoch im Stratum spinosum (Abb. 24c,d). Weiterhin konnten verzweigte und intensiv fluoreszierende melanozytäre Zellfortsätze (Dendriten) nachgewiesen werden (Abb. 24c,d).

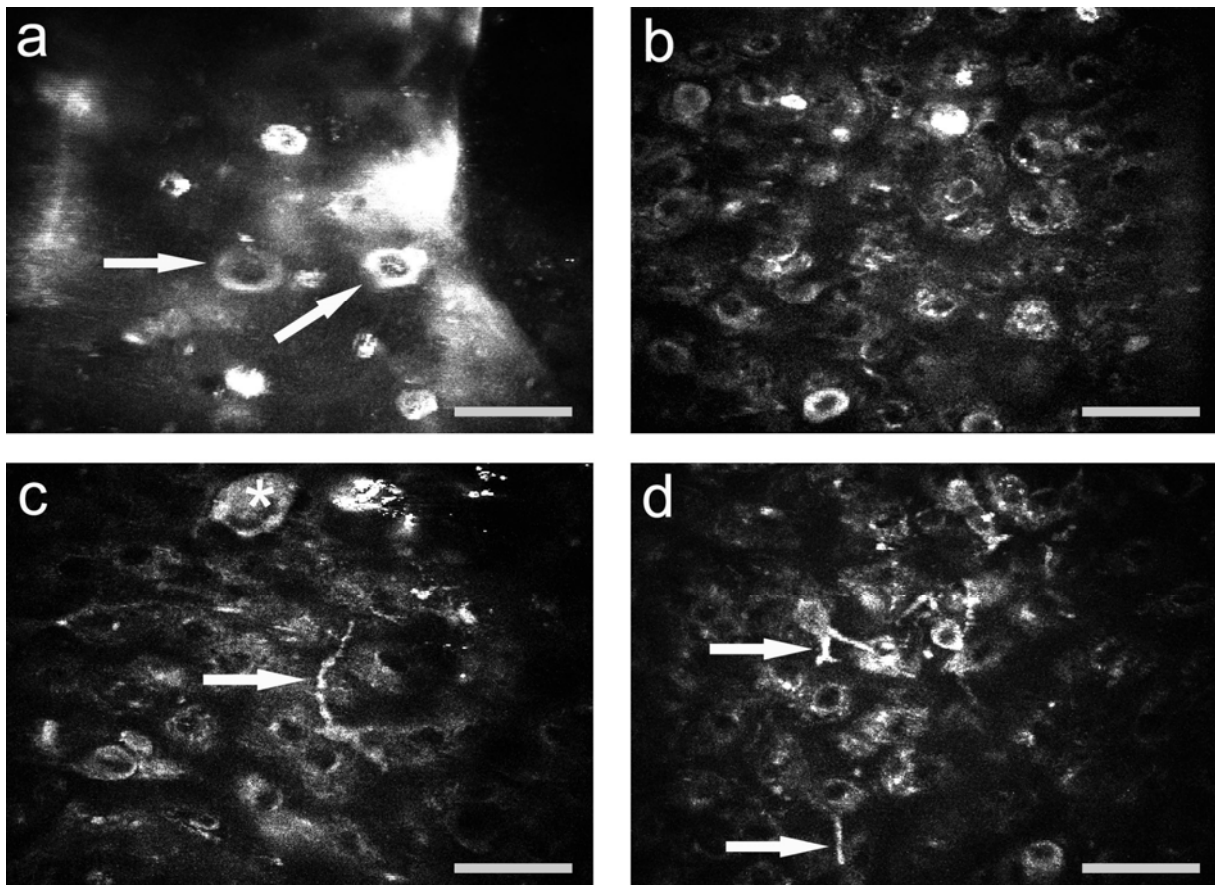


Abb. 24: Horizontale MLT-Schnittbilder eines Malignen Melanoms mit aufgestiegenen Melanozyten (a: Pfeile), dendritischen Melanozyten (c, d: Pfeile) und pleomorphen Melanozyten (c: Stern). $\lambda_{\text{ex}}=760 \text{ nm}$, Messbalken: $40\mu\text{m}$

Durch eine systematische Bildbeurteilung und vergleichende Analyse der fluoreszenzoptischen Schnittbilder mit den konventionellen histopathologischen Präparaten konnten typische Merkmale des Malignen Melanoms identifiziert werden. Dazu zählen:

Aufsteigende Melanozyten

Im Stratum spinosum, granulosum und corneum fanden sich beim Malignen Melanom atypische Melanozyten. Diese Zellen traten häufig hyperintens sowie pleomorph in Erscheinung und zeigten eine selektive Anregbarkeit bei 800 nm.

Pleomorphes Zellbild

Im Gegensatz zum gleichmäßigen epidermalen Zellbild benigner melanozytärer Läsionen fanden sich beim Malignen Melanom Unregelmäßigkeiten der Zellgröße und Zellform. Die atypischen Zellen zeigten ein balloniertes, spindelförmiges oder dendritisches Erscheinungsbild mit veränderter Kern-Plasma-Relation.

Destruierter Zellverband

Maligne Melanome waren durch einen unregelmäßigen und melanozytär durchsetzten epidermalen Zellverband mit strukturarmen, zum Teil lückenhaften Arealen gekennzeichnet. Die Fluoreszenzintensität der Keratinozyten zeigte sich uneinheitlich, teils abgeschwächt bis aufgehoben. Einige Läsionen imponierten durch ein nicht darstellbares Stratum granulosum.

Unscharfe Zellgrenzen

Die Keratinozyten zeigten sich im Rahmen der Melanominfiltration häufig fluoreszenzarm und unscharf begrenzt.

Unregelmäßige Zellabstände

Die interzellulären Abstände kamen oft uneinheitlich und vergrößert zur Darstellung.

Dendritische Zellen

Bei den Malignen Melanomen fanden sich gehäuft hyperintense Zellen mit verzweigten dendritischen Zellfortsätzen. Diese konnten den maligne transformierten Melanozyten zugeordnet werden.

5.6 Statistische Auswertung

Datenumfang und Diagnosenverteilung

Im Rahmen der Hauptstudie wurden siebenundneunzig der einhundert vermessenen Läsionen operativ entfernt und histopathologisch befundet. Die verbleibenden drei Fälle konnten klinisch eindeutig als typische melanozytäre Nävi ohne Dysplasiezeichen eingeordnet werden, die keine Exzision gerechtfertigt hätten. Aufgrund der erstmaligen Anwendung der Multiphotonen-Lasertomographie im klinischen Umfeld konnten bis zur Optimierung aller Messparameter, vor allem zu Beginn der Studie, einige Läsionen nur mit unzureichender Qualität untersucht werden. System- und verfahrenstechnische Einschränkungen beeinflussten die Datenerhebung zusätzlich. Läsionen im Bereich der Handflächen und Fußsohlen waren aufgrund der maximalen Untersuchungstiefe von ca. 200 µm nur eingeschränkt darstellbar. Kritische sowie schwer zugängliche Hautareale (z. B. Augenregion, Intertrigines) konnten ausschließlich *ex vivo* vermessen werden. Die Bildqualität wurde weiterhin durch Bewegungsartefakte beeinflusst, die gehäuft bei unruhigen oder schwer zu lagernden Probanden auftraten. Vor der statistischen Auswertung wurden alle Bilder qualitativen Mindestanforderungen unterzogen.

Aus den zuvor genannten Gründen reduzierte sich das statistisch analysierte Datenmaterial der Hauptstudie auf 83 Läsionen mit insgesamt 53 *in vivo* und 72 *ex vivo* Bildstapeln. Jeder Bildstapel beinhaltete bis zu 100 Einzelbilder in unterschiedlichen Tiefen und/oder an unterschiedlichen Arealen einer Läsion. Die Verteilung der Diagnosen ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Tab. 2: Diagnosenverteilung der Vor- und Hauptstudie

Diagnose	Vorstudie	Hauptstudie
Malignes Melanom	8	18
Melanoma in situ		8
melanozytärer Nävus	6	51
seborrhoische Keratose	1	3
Dermatofibrom		1
Morphea		1
Narbengewebe		1
gesamt	15	83

Unter den 26 Malignen Melanomen der Hauptstudie fanden sich acht in situ Melanome, 1 noduläres und 1 ulzeriertes Melanom. Die Tumordicke nach Breslow umfasste den Bereich von 0,3 mm bis 11 mm und betrug durchschnittliche 1,79 mm. Mit 51 Läsionen waren die melanozytären Nävi unter allen Diagnosen am häufigsten vertreten. In die Studie wurden weiterhin einzelne pigmentierte und klinisch suspekt imponierende Hautveränderungen einbezogen, die histopathologisch als seborrhoische Keratose, Dermatofibrom, Morphea und Narbengewebe eingeordnet werden konnten.

Analyse der Melanommerkmale

Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit der im Rahmen der Vorstudie charakterisierten Differenzierungsmerkmale des Malignen Melanoms wurden alle Fluoreszenzintensitätsbilder der Hauptstudie durch 4 unabhängige Ärzte der Klinik systematisch analysiert und beurteilt. Die dabei gewonnenen Daten dienten der Ermittlung von statistischen Kennwerten (Tab. 3).

Tab. 3: Sensitivität und Spezifität der Differenzierungsmerkmale des Malignen Melanoms

Merkmal	Sensitivität			Spezifität		
	in vivo	ex vivo	gesamt	in vivo	ex vivo	gesamt
aufsteigende Melanozyten	48%	83%	65%	83%	78%	80%
pleomorphes Zellbild	65%	87%	76%	86%	80%	82%
destruierter Zellverband	58%	92%	75%	97%	88%	91%
unscharfe Zellgrenzen	65%	83%	74%	89%	81%	84%
unregelmäßige Zellabstände	65%	94%	80%	85%	69%	75%
dendritische Zellen	39%	48%	43%	97%	96%	96%

Tab. 4: Rangfolge der einzelnen Merkmale, getrennt nach Sensitivität und Spezifität

Merkmal	Sensitivität (gesamt)
unregelmäßige Zellabstände	80%
pleomorphes Zellbild	76%
destruierter Zellverband	75%
unscharfe Zellgrenzen	74%
aufsteigende Melanozyten	65%
dendritische Zellen	43%

Merkmal	Spezifität (gesamt)
dendritische Zellen	96%
destruierter Zellverband	91%
unscharfe Zellgrenzen	84%
pleomorphes Zellbild	82%
aufsteigende Melanozyten	80%
unregelmäßige Zellabstände	75%

Die Gesamtsensitivität der Differenzierungsmerkmale variierte zwischen 43% und 80%, wobei 4 der 6 Kriterien Werte $\geq 74\%$ aufwiesen (Tab. 4). Dazu zählten in aufsteigender Reihenfolge die Merkmale *unscharfe Zellgrenzen* (74%), *destruierter Zellverband* (75%), *pleomorphes Zellbild* (76%) und *unregelmäßige Zellabstände* (80%). Deutlich sensitiver war die Untergruppe der *ex vivo* Daten, mit Werten bis zu 94%. Das Merkmal *dendritische Zellen* zeigte trotz der geringen Sensitivität von 43% die beste Spezifität mit 96%. Weniger spezifisch waren die Merkmale *destruierter Zellverband* (91%), *unscharfe Zellgrenzen* (84%), *pleomorphes Zellbild* (82%), *aufsteigende Melanozyten* (80%) und *unregelmäßige Zellabstände* (75%).

Analyse der Multiphotonen-Lasertomographie

Im Verlauf der Bildbeurteilung mussten die Untersucher anhand der einzelnen Differenzierungsmerkmale jede Läsion bezüglich ihrer Dignität klassifizieren. Die daraus gewonnenen Daten ermöglichen erste Aussagen zur klinischen Anwendbarkeit und Zuverlässigkeit der Multiphotonen-Lasertomographie als diagnostisches Verfahren.

Tab. 5: Klassifizierungsergebnisse

Untersucher	Sensitivität			Spezifität		
	in vivo	ex vivo	gesamt	in vivo	ex vivo	gesamt
Arzt 1	76%	95%	86%	97%	86%	90%
Arzt 2	76%	90%	83%	75%	71%	72%
Arzt 3	71%	90%	81%	72%	69%	70%
Arzt 4	76%	95%	86%	75%	71%	72%
gesamt	75%	93%	84%	80%	74%	76%

Tabelle 5 veranschaulicht die Ergebnisse der diagnostischen Klassifizierung in benigne und maligne (MM) melanozytäre Läsionen durch den jeweiligen Arzt. Daraus konnte eine durchschnittliche Gesamtsensitivität und Gesamtspezifität von 84% und 76% für das Verfahren der MLT ermittelt werden.

Die Werte verdeutlichen, dass die Untersucher in ihren diagnostischen Entscheidungen nur gering divergierten, was für eine gute und einheitliche Anwendbarkeit der Differenzierungsmerkmale spricht. Nur Arzt 1 grenzt sich mit einer Gesamtspezifität von 90% von seinen Kollegen ab. Ähnlich wie in Tabelle 3 zeigt sich auch in Tabelle 5 eine deutliche Abweichung der *ex vivo* Sensitivität von

der *in vivo* Sensitivität, die sich auf bessere Messbedingungen während der *ex vivo* Datenerhebung zurückführen lässt.

Zusätzlich bestimmten wir die positiven und negativen Vorhersagewerte (PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive value) getrennt nach *in* und *ex vivo* Messungen für alle Untersucher (Tab. 6). Diese ermöglichen Aussagen über die Wahrscheinlichkeit, mit der eine als bös- oder gutartig klassifizierte melanozytäre Läsion auch tatsächlich bös- oder gutartig ist. Anhand der Werte wird deutlich, dass die als maligne eingestuften Hautveränderungen nur in 65% der Fälle auch bösartig waren und die als benigne klassifizierten Läsionen sich in 91% der Fälle auch als gutartig herausstellten.

Tab. 6: Positive und negative Vorhersagewerte

Untersucher	PPV			NPV		
	in vivo	ex vivo	gesamt	in vivo	ex vivo	gesamt
Arzt 1	94%	74%	82%	86%	98%	93%
Arzt 2	67%	56%	60%	83%	95%	90%
Arzt 3	63%	54%	58%	79%	95%	88%
Arzt 4	67%	57%	61%	83%	97%	91%
gesamt	73%	60%	65%	83%	96%	91%

Logistische Regressionsanalyse

Im Rahmen der logistischen Regressionsanalyse wurden in einem mehrstufigen Analyse- und Auswahlprozess die Merkmale/Merkmalsskombinationen ermittelt, die auf die Klassifizierung des Malignen Melanoms einen signifikanten Einfluss hatten. Tabelle 7 zeigt, dass alle Differenzierungsmerkmale sich in unterschiedlichen Kombinationen als signifikant erwiesen haben. Besonders häufig finden sich jedoch die Merkmale *destruierter Zellverband*, *unscharfe Zellgrenzen*, *pleomorphes Zellbild* und *dendritische Zellen*. Zusätzlich wurden regressionsanalytisch Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit ermittelt. Die Genauigkeit (engl. accuracy) entspricht dabei der Wahrscheinlichkeit einer richtigen Klassifizierung, richtig positiv (MM) oder richtig negativ (benigne Läsion). Unter Verwendung der als signifikant ermittelten Merkmale war es möglich, bis zu 85% aller *in vivo* und 97% aller *ex vivo* Läsionen richtig zu klassifizieren (Tab. 7). Interessanterweise zeigte die logistische Regression, dass die Beurteilung von nur wenigen signifikanten Merkmalen zum Teil ähnliche bis bessere Sensitivitäts- und Spezifitätswerte aufweist, verglichen mit der Beurteilung aller Differenzierungsmerkmale. Konkret fand sich am Beispiel des Untersuchers 3 bei vergleichbaren Sensitivitätswerten ein deutlicher Anstieg der *ex vivo* Spezifität von 69% (Tab. 5) auf 100% (Tab. 7), unter Verwendung der Merkmale *destruierter Zellverband*, *pleomorphes Zellbild* und *aufsteigende Melanozyten*.

Tab. 7: Regressionsanalytisch ermittelte signifikante Differenzierungsmerkmale

in vivo	Arzt 1	Arzt 2	Arzt 3	Arzt 4
Merkmale	destr. Zellverband unregelm. Abstände	pleomorph. Zellbild dendritische Zellen	destr. Zellverband unscharfe Zellgrenzen	destr. Zellverband unregelm. Abstände
Sensitivität	71%	71%	71%	62%
Spezifität	94%	91%	88%	94%
Genauigkeit	85%	83%	81%	81%

ex vivo	Arzt 1	Arzt 2	Arzt 3	Arzt 4
Merkmale	destr. Zellverband unscharfe Zellgrenz. dendritische Zellen	destr. Zellverband pleomorphes Zellbild dendritische Zellen	destr. Zellverband pleomorphes Zellbild aufsteigende Melanoz.	destr. Zellverband unscharfe Zellgrenz. /
Sensitivität	86%	91%	91%	76%
Spezifität	92%	90%	100%	94%
Genauigkeit	90%	90%	97%	89%

Güte der Urteilsübereinstimmung

Die Überprüfung der Urteilsübereinstimmung zwischen den 4 Untersuchern bezüglich der Anwendung der einzelnen Melanommerkmale erfolgte mit Hilfe der Kappa (κ)-Statistik (siehe Kap. 4.9). Die dabei ermittelten Werte sind der Abbildung 25 zu entnehmen.

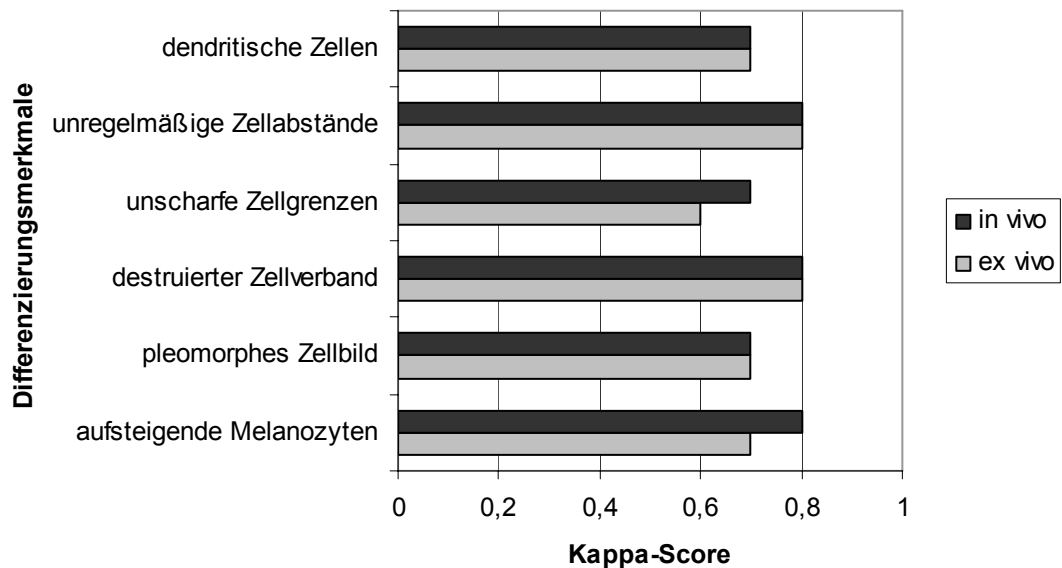


Abb. 25: Grafische Darstellung des Übereinstimmungsmaßes der Untersucher

In Anlehnung an Landis und Koch (1977) zeigte sich bis auf das Merkmal *unscharfe Zellgrenzen* ($\kappa=0,6$ *ex vivo* - mittelgradige Übereinstimmung) bei allen Merkmalen eine gute Übereinstimmung ($\kappa \geq 0,61$). Daraus wird ersichtlich, dass zwischen den einzelnen Untersuchern ein hohes Maß der Urteilsübereinstimmung bestand.

5.7 Messung der Fluoreszenzabklingkinetik

Quantitative Fluoreszenzlebensdauermessung

Ergänzend zur Fluoreszenzintensitätsmessung wurden spezielle zeitkorrelierte Einzelphotonenzählungen (siehe Kap. 4.7) zur Charakterisierung der Fluoreszenzabklingkinetik verschiedener epidermaler Zellpopulationen durchgeführt (Abb. 26). Insgesamt konnten 13 melanozytäre Nävi und 10 Maligne Melanome vermessen werden. Die Berechnung der Fluoreszenzabklingzeiten erfolgte durch biexponentielle mathematische Approximationsverfahren (siehe Kap. 2.6). Derart wurde an 84 Messpunkten innerhalb des Zytoplasmas von Keratinozyten (Abb. 26a,b) sowie Melanozyten (Abb. 26c,d) das Fluoreszenzabklingverhalten bestimmt.

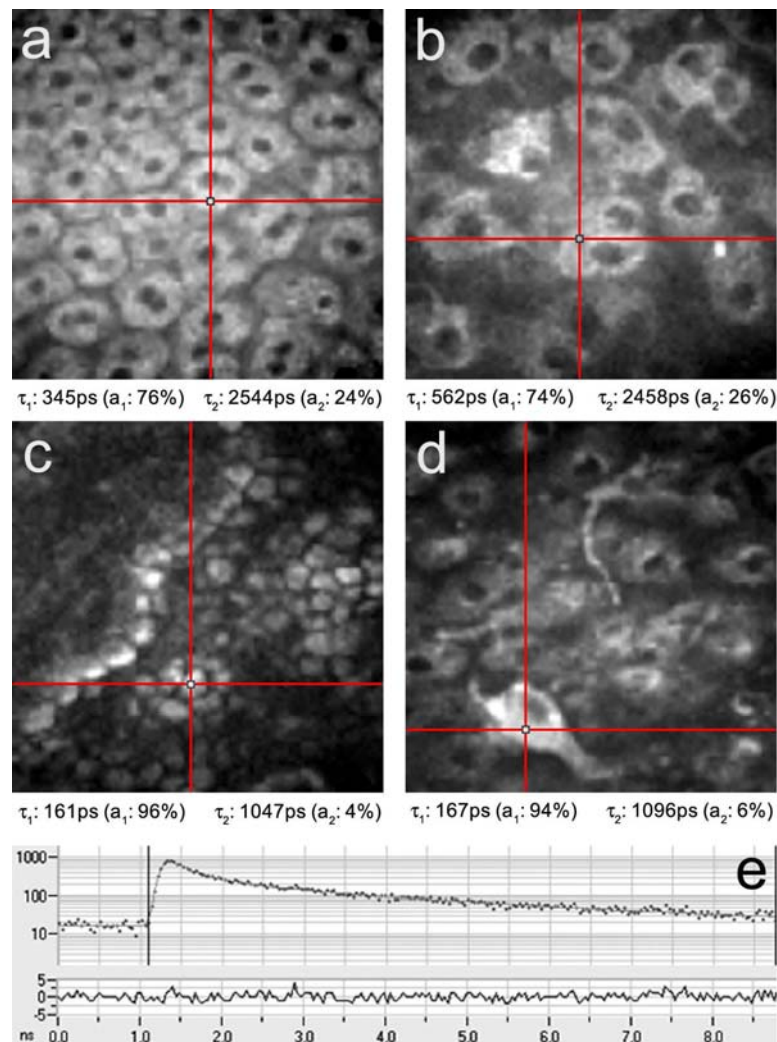


Abb. 26: TCSPC-Messungen an Keratinozyten (a, b) und Melanozyten (c, d) eines melanozytären Nävus (a, c) und eines Malignen Melanoms (b, d). Die einzelnen Bildunterschriften geben die im Messpunkt (Kreuz) ermittelten Werte der Fluoreszenzabklingzeiten (τ_1 , τ_2) sowie die zugehörigen Amplituden (a_1 , a_2) wieder. e: Fluoreszenzabklingkurve, $\lambda_{ex}=760$ nm

Ein Vergleich der Fluoreszenzabklingzeiten von Keratinozyten und Melanozyten zeigte deutliche Unterschiede (Tab. 8 und 9). Melanozyten waren gekennzeichnet durch eine kurze Hauptkomponente $\tau_1=140\pm32$ ps mit einer Amplitude von $a_1=93\pm3\%$ sowie einer längeren Nebenkompente $\tau_2=1076\pm357$ ps mit einer Amplitude von $a_2=7\pm3\%$. Demgegenüber besaß die keratinozytäre Fluoreszenz eine allgemein längere Lebensdauer mit $\tau_1=445\pm148$ ps (a_1 : $76\pm5\%$) und $\tau_2=2269\pm345$ ps (a_2 : $24\pm5\%$). Es ist zu beachten, dass die Fluoreszenzlebensdauern und die Amplituden unabhängige Parameter der Fluoreszenzabklingkinetik sind.

Als weiteres Unterscheidungskriterium konnte das Amplitudenverhältnis a_1/a_2 herangezogen werden, dass bei Keratinozyten mit 3 ± 1 deutlich geringer als bei Melanozyten mit 20 ± 14 ausfiel.

Tab. 8: Mittelwerte mit Standardabweichung (s) der keratinozytären Fluoreszenzlebensdauer

Läsionen	Keratinozyten									
	τ_1 (ps)		a_1 (%)		τ_2 (ps)		a_2 (%)		a_1/a_2	
	Mittelwert	s	Mittelwert	s	Mittelwert	s	Mittelwert	s	Mittelwert	s
melanoz. Nävi	429	135	74	6	2227	333	26	6	3	1
MM	461	161	77	5	2312	359	23	5	3	1
gesamt	445	148	76	5	2269	345	24	5	3	1

Tab. 9: Mittelwerte mit Standardabweichung (s) der melanozytären Fluoreszenzlebensdauer

Läsionen	Melanozyten									
	τ_1 (ps)		a_1 (%)		τ_2 (ps)		a_2 (%)		a_1/a_2	
	Mittelwert	s	Mittelwert	s	Mittelwert	s	Mittelwert	s	Mittelwert	s
melanoz. Nävi	136	33	94	3	1061	376	6	3	23	15
MM	146	31	92	3	1097	339	8	3	16	11
gesamt	140	32	93	3	1076	357	7	3	20	14

Bei der läsionsübergreifenden Betrachtung einzelner Zellpopulationen (Keratinozyten, Melanozyten) fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen melanozytären Nävi und Malignen Melanomen (Abb. 26, Tab. 8 und 9). Vielmehr wurde deutlich, dass eine klare Abgrenzung eines maligne entarteten Melanozyten anhand seiner Fluoreszenzabklingkinetik nicht vorgenommen werden konnte.

Qualitative Fluoreszenzlebensdauerermessung

Die zuvor beschriebene Messung der Fluoreszenzabklingkinetik erlaubte eine quantitative Analyse einzelner Bildpunkte innerhalb der Fokusebene. Um das Abklingverhalten aller Pixel einheitlich und schnell beurteilen zu können, wurde eine farbcodierte Visualisierung der gesamten Fluoreszenzabklingdaten eines Bildes durchgeführt (Abb. 27).

Es zeigte sich eine kontinuierliche Verschiebung der gemittelten Fluoreszenzlebensdauern in Abhängigkeit vom intrazellulären Melaningehalt. Dabei korrespondierten blau-grüne Regionen mit den vergleichsweise langen Abklingzeiten von melaninfreien/melaninarmen Keratinozyten und gelbe Regionen mit der kurzen Abklingkinetik melaninreicher Zellen (z. B. Melanozyten). Abbildung 27 zeigt in vergleichender Darstellung des Stratum spinosum beim melanozytären Nävus (Abb. 27a,b,c) einzelne grün-gelb-codierte melaninhaltige Keratinozyten (Abb. 27b) mit intrazellulären gelben Pigmentclustern während beim MM (Abb. 27d,e,f) zahlreiche gelb-codierte pleomorphe Melanozyten (Abb. 27e) den Zellverband dominieren. Analog dazu findet sich eine Verschiebung der Verteilungshistogramme von langen (blau) zu kurzen (gelb) Abklingzeiten (Abb. 27c,f).

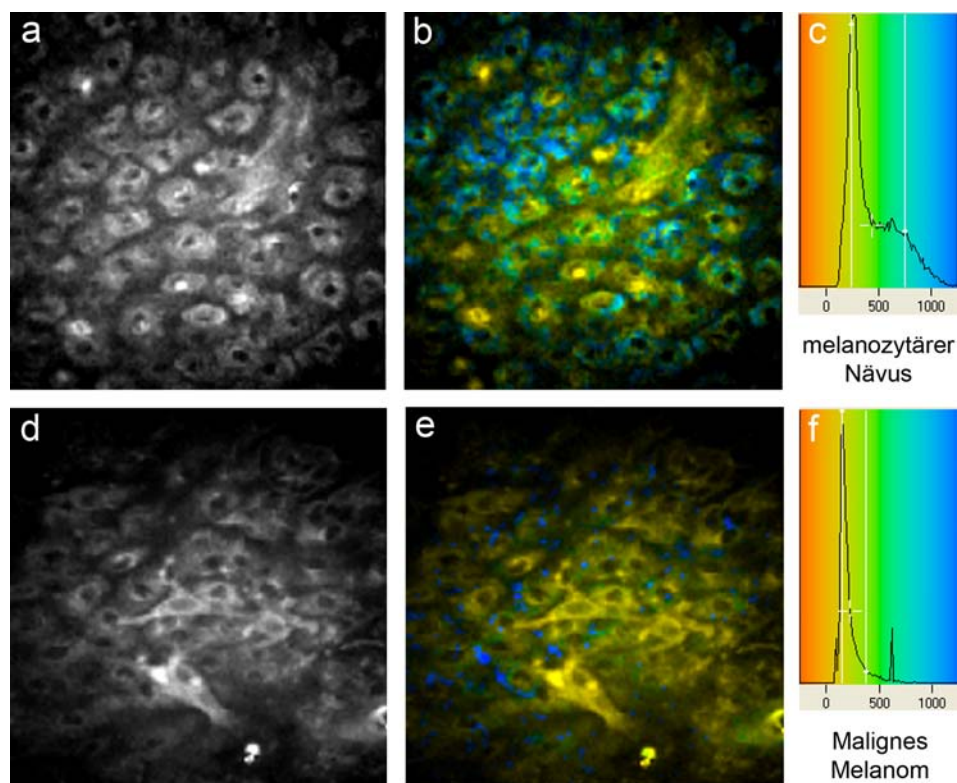


Abb. 27: Vergleichende Darstellung von konventionellen Fluoreszenzintensitätsabbildungen (a, d) mit farbcodierten Abbildungen der Fluoreszenzlebensdauer (b, e) und den zugehörigen Verteilungshistogrammen (c, f) eines melanozytären Nävus (a, b, c) und eines Malignen Melanoms (d, e, f). $\lambda_{\text{ex}}=760 \text{ nm}$

5.8 Messung der Fluoreszenzspektren

Durch Erweiterung der Detektoreinheit um einen Polychromator mit 16-Kanal-Multi-Anoden-PMT war es möglich, das emittierte Fluoreszenzlicht auf 16 spektrale Kanäle aufzuteilen und wellenlängenabhängig auszuwerten. Derart wurden 4 Gewebeproben (1 melanozytärer Nävus, 1 Malignes Melanom, 2 Referenzläsionen gesunder Haut) mit Anregungswellenlängen von 760 nm und 800 nm vermessen. Abbildung 28 verdeutlicht die spektralen Merkmale von gesunder Haut und einem melanozytären Nävus jeweils im Vergleich zum Malignen Melanom.

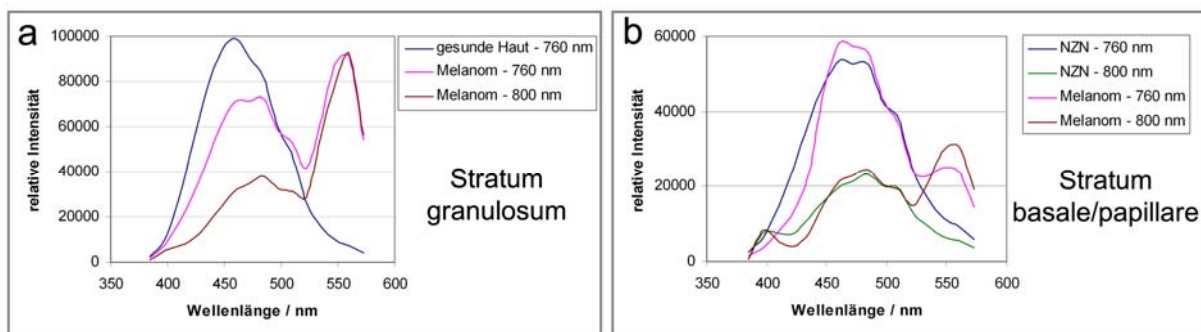


Abb. 28: Vergleich der Emissionsspektren gesunder Haut, eines melanozytären Nävus (NZN) und eines Malignen Melanoms gemessen in unterschiedlichen epidermalen Zellschichten.

Alle Läsionen waren durch einen breiten Hauptemissionspeak bei ca. 470 nm gekennzeichnet. Bei einer Anregungswellenlänge von 800 nm fand sich im Vergleich zu 760 nm eine diskrete Rotverschiebung der Spektren, eine abgeschwächte Fluoreszenzintensität bei 470 nm sowie ein zusätzlicher Peak bei 400 nm ($\lambda_{ex}/2$). Dieser Peak ist kennzeichnend für SHG-Effekte des Kollagens und konnte vorrangig im Bereich der dermoepidermalen Junktionszone beobachtet werden. Weiterhin zeigte das Maligne Melanom, unabhängig von der Gewebetiefe (Fokusebene), eine erhöhte Fluoreszenzintensität im langwelligen Bereich ab 525 nm mit einem Fluoreszenzpeak bei ca. 550 nm.

6 Diskussion

6.1 Multiphotonen angeregte Fluoreszenzbildgebung

Die Multiphotonen-Lasertomographie ist ein bildgebendes Verfahren, das zur nichtinvasiven Beurteilung melanozytärer Hautveränderungen eingesetzt werden kann. In Übereinstimmung mit anderen Publikationen zeigte sich eine gute Anregbarkeit epidermaler Zellen im nahen infraroten Spektralbereich (Koenig und Riemann 2003, Masters und So 1999). Derart gelang es, sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* hochaufgelöste Schnittbilder der Haut anzufertigen. Innerhalb der Epidermis konnten nicht nur einzelne Zellschichten unterschieden, sondern auch zelluläre wie subzelluläre Strukturen (Zellkern, Melanosomen) dargestellt werden. Da viele der entscheidenden Kriterien zur Differenzierung einer malignen von einer benignen melanozytären Veränderung in der Epidermis lokalisiert sind, war die limitierte Eindringtiefe von 200 µm in den meisten Fällen ausreichend.

Im Rahmen der Studie wurden erstmals morphologische Fluoreszenzmerkmale benigner und maligner melanozytärer Läsionen an einer großen Zahl von Probanden unter klinischen Bedingungen untersucht. Dabei konnten 6 charakteristische Differenzierungsmerkmale des Malignen Melanoms spezifiziert werden. Kennzeichnend für die meisten Melanomfälle war ein inhomogener, destrukturierter Zellverband mit unscharf begrenzten, zum Teil pleomorphen Einzelzellen. Die interzellulären Abstände waren vergrößert. Es fanden sich hyperintense, aufsteigende Melanozyten mit dendritischen Zellfortsätzen. Die Merkmale *aufsteigende Melanozyten*, *pleomorphes Zellbild* und *dendritische Zellen* zeigten eine gute Übereinstimmung mit der Histopathologie, wohingegen die Merkmale *destruierter Zellverband*, *unscharfe Zellgrenzen* und *unregelmäßige Zellabstände* ausschließlich in den Schnittbildern der MLT zu finden waren. Trotz der guten Korrelation mit den histopathologischen Melanommerkmalen deuten gerade die letztgenannten Kriterien auf verfahrenstechnische Unterschiede hin. Während bei der Lichtmikroskopie die Affinität einzelner Zellstrukturen zu spezifischen Farbstoffen ausgenutzt wird, können mit Hilfe der MLT endogene Fluorophore nachgewiesen werden. Da der überwiegende Teil der zellulären Fluoreszenz vom NAD(P)H stammt (Masters et al. 1998), lassen sich im Unterschied zur Lichtmikroskopie vorrangig stoffwechselaktive Organellen direkt darstellen.

Erklärend für die zuvor genannten Fluoreszenzmerkmale des Malignen Melanoms können verschiedene neoplastische Prozesse angeführt werden. Im Verlauf der malignen Proliferation infiltrieren funktionsgestörte Melanozyten den keratinozytären Zellverband und bewirken einen Strukturverlust. Das massive Zellaufkommen führt zur Mangelversorgung der oberen epidermalen Schichten. Bedingt durch Nekrose- sowie Apoptosevorgänge kommt es zum Erliegen der intrazellulären Stoffwechselprozesse, was sich in einer verminderten NAD(P)H Fluoreszenz zeigt.

6.2 Selektive Melaninfluoreszenz

Melanin besitzt im Vergleich zu anderen endogenen Fluorophoren der Haut ein vom nahen UV- bis zum nahen NIR-Spektralbereich monoton fallendes Absorptionsspektrum (Teuchner et al. 2000, 2003). Aufgrund dieser speziellen Eigenschaft gelang es, Melanin mit einer Wellenlänge von 800 nm anzuregen. Da Keratinozyten bei dieser Wellenlänge nur unzureichend angeregt werden können, war es möglich, melaninhaltige Zellen (z. B. Melanozyten), innerhalb des Zellverbandes selektiv darzustellen (siehe Kap. 2.7). Von entscheidender Bedeutung war dabei die Differenzierung dendritischer Zellen. Häufig in Melanomen, aber auch in melanozytären Nävi beobachtete Zellen mit verzweigten Fortsätzen konnten so der Gruppe der Melanozyten und nicht, wie ursprünglich angenommen, den Langerhans-Zellen zugeordnet werden.

Interessanterweise fanden sich dendritische Zellfortsätze fast ausschließlich bei Malignen Melanomen und nur sehr selten in gesunder Haut sowie in melanozytären Nävi. Erklärend dafür könnte sowohl eine gesteigerte Melaninproduktion als auch eine gestörte Melaninweitergabe innerhalb der epidermalen Melanineinheiten beim Melanom sein. Durch beide Faktoren kommt es zur Akkumulation von Melanosomen in den Zellfortsätzen, die fluoreszenzoptisch nachweisbar werden. Somit wird deutlich, dass unter gesunden Stoffwechselverhältnissen der Nachweis von Dendriten durch eine schnelle Melaninweitergabe und der damit verbundenen geringen intramelanozytären Melaninkonzentration nur selten gelingt (Yamashita et al. 2005).

6.3 Statistische Auswertung

Bewertung der Differenzierungsmerkmale

Die Evaluierung der einzelnen Differenzierungsmerkmale erfolgte durch 4 unabhängige Ärzte der Klinik. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass 4 der 6 Merkmale bei mehr als 74% aller malignen Läsionen zu finden waren. Die Merkmale *dendritische Zellen* und *aufsteigende Melanozyten* hingegen traten nur bei 43% und 65% aller Melanome auf, lieferten jedoch aufgrund ihrer hohen Gesamtspezifität von 96% bzw. 80% wichtige diagnostische Hinweise.

Insgesamt zeigte sich, dass kein Merkmal bei mehr als 80% der untersuchten Melanome in Erscheinung trat. Dies deutet auf eine hohe Variabilität der Melanommorphologie in den MLT-Schnittbildern hin. Die Merkmalsausprägung erstreckte sich von kaum wahrnehmbaren morphologischen Veränderungen beim Melanoma in situ bis zum vollständigen Merkmalsbild beim fortgeschrittenen invasiven Malignen Melanom. Gleichzeitig muss berücksichtigt werden, dass die fluoreszenzoptischen Abbildungen nur einen umschriebenen Bereich (siehe Kap. 4.6) innerhalb der Läsion erfassen. Eine ganzheitliche Beurteilung bis an die Grenzen der Hautveränderung erfordert mehrere Messungen an verschiedenen Stellen der melanozytären Läsion. Auch bei der Befundung konventioneller histopathologischer Präparate, insbesondere in Frühstadien oder bei Kombination eines Melanoms mit einem Nävus, sind mehrere Schnitte zur sicheren diagnostischen Einordnung notwendig. Die zahlreichen histopathologischen Differenzierungskriterien werden ebenfalls läsionsabhängig nur teilweise erfüllt.

Interessanterweise fanden sich die untersuchten Merkmale nicht nur beim Malignen Melanom, sondern auch bei einigen, vorrangig als dysplastische Nävi klassifizierten melanozytären Läsionen. Der dysplastische oder Clark-Nävus zeigt nicht nur klinisch und histologisch einzelne Melanommerkmale sondern imponiert auch fluoreszenzoptisch durch ein malignes Erscheinungsbild.

Vergleicht man die Gruppe der *ex vivo* Daten mit der Gruppe der *in vivo* Daten, so fällt auf, dass für gleiche Kriterien eine bis zu 35% höhere Sensitivität bei den *ex vivo* Messungen erzielt wurde. Unterschiede zwischen beiden Datengruppen resultieren vorrangig aus den erschwerten Messbedingungen während der Datenaquisition am Probanden und der damit verbundenen geringeren Bildqualität.

Störgrößen während der *in vivo* Messung waren:

- Bewegungsartefakte
- erschwerte Fixation des Koppelstückes durch Unebenheiten der Hautoberfläche (subkutane Knochen/Knorpel, Intertrigines) sowie stark behaarte Hautpartien oder eine vermehrte Transpiration

Unter den zuvor genannten Störgrößen kam den Bewegungsartefakten die größte Bedeutung zu. Durch die direkte Abhängigkeit der Bildqualität von der Bildaufnahmezeit und der damit verbundenen Anfälligkeit für Bewegungsartefakte wurde der überwiegende Teil der *in vivo* Messungen mit kurzen Aufnahmezeiten von bis zu 7 Sekunden pro Bild angefertigt. Dadurch konnte der Einfluss dieser Störgröße weitestgehend reduziert werden. *Ex vivo* Messungen hingegen wurden qualitätsoptimiert mit einer Aufnahmezeit von 13 Sekunden pro Bild durchgeführt.

Bewertung der MLT im Rahmen der Melanomdiagnostik

Die von den Untersuchern getroffenen diagnostischen Entscheidungen (MM versus benigne Läsion) wurden mit den histopathologischen Befunden verglichen und statistisch aufgearbeitet. Die Ergebnisse ermöglichen erste Aussagen zur Sensitivität und Spezifität der Multiphotonen-Lasertomographie im Rahmen der Melanomdiagnostik (Tab. 10).

Tab. 10: Klassifizierungsergebnisse

Untersucher	Sensitivität	Spezifität
Arzt 1	86%	90%
Arzt 2	83%	72%
Arzt 3	81%	70%
Arzt 4	86%	72%
gesamt	84%	76%

Alle Untersucher zeigten sowohl bei der Sensitivität mit Werten zwischen 81% und 86% (Gesamtsensitivität) als auch bei der Spezifität mit Werten zwischen 70% und 90% (Gesamtspezifität) gute Klassifizierungsergebnisse (Tab. 10). Die deutlichen Unterschiede zwischen den *in* und *ex vivo* Werten der Sensitivität (Tab. 5) beruhten auf einer besseren Beurteilbarkeit der nahezu artefaktfreien *ex vivo* Schnittbilder. Vergleicht man die Untersucher untereinander, so zeigen sich, bei gering divergierenden Werten der Gesamtsensitivität, deutliche Abweichungen der

Gesamtspezifität von bis zu 20% (Tab. 10). Ursächlich dafür war die unterschiedliche MLT-Erfahrung der einzelnen Ärzte während der Beurteilung und Interpretation der fluoreszenzoptischen Schnittbilder. Die Werte belegen, dass der Studienleiter (Arzt 1) mit der größten MLT-Erfahrung die besten Klassifizierungsergebnisse verzeichnete, während die anderen Kollegen einheitlich schlechter abschnitten. Dies verdeutlicht, dass die diagnostische Sicherheit der Methode durch zusätzliche Schulungen der Untersucher signifikant erhöht werden könnte.

Die dicht beieinander liegenden Werte der Untersucher 2 bis 4 lassen vermuten, dass die umfassenden histopathologischen Kenntnisse des Arztes 2 (Facharzt mit histopathologischer Spezialisierung) keinen Einfluss auf die Interpretation und Bewertung der MLT-Schnittbilder hatten.

Vergleicht man die durchschnittliche Sensitivität (84%) und Spezifität (76%) der MLT mit denen der Auflichtmikroskopie, zeigen sich ähnliche Werte (Argenziano et al. 2006). In einer Metastudie zur Melanomdiagnostik stellte Bafounta et al. (2001) die Auflichtmikroskopie der klinischen Diagnostik ohne zusätzliche technische Hilfsmittel gegenüber. Er zeigte, dass die Auflichtmikroskopie durch geschultes Personal der klinischen Routinediagnostik überlegen war, mit einer Sensitivität zwischen 75% und 96% sowie einer Spezifität im Bereich von 79% bis 98%.

Interessanterweise berichten CLSM-Studien humaner Haut über vergleichbare morphologische Strukturen, insbesondere beim Malignen Melanom (Gerger et al. 2006, Yamashita et al. 2005). Dabei konnte eine Sensitivität von 91% und eine Spezifität von 99% für die Klassifizierung melanozytärer Läsionen mittels CLSM (Reflektionsmodus) erreicht werden (Gerger et al. 2006). Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit war der Studienaufbau jedoch dahingehend verändert, dass pro Proband nur 2, von der Studienleitung vorselektierte Bilder beurteilt wurden. Dieses Vorgehen entspricht jedoch nicht der mitunter schwierigen *in vivo* Datenerhebung im klinischen Alltag und ist daher mit unseren Ergebnissen nur bedingt vergleichbar.

Ergänzend zur Sensitivität und Spezifität bestimmten wir die positiven und negativen Vorhersagewerte. Gesamtheitlich wurde ein PPV von 65% und ein NPV von 91% erreicht. Daraus geht hervor, dass 9% der als gutartig klassifizierten Läsionen malignen Ursprungs waren. Dabei handelt es sich vorrangig um *in situ* Melanome, bei denen die pathologischen Veränderungen auf einen kleinen Bereich der

Epidermis begrenzt waren. Die Analyse des Datenmaterials zeigte, dass vorrangig *in vivo* vermessene Läsionen falsch (benigne) diagnostiziert wurden. Beim überwiegenden Teil der korrespondierenden *ex vivo* Daten wurde das Maligne Melanom richtig erkannt. Die zuvor diskutierten Ergebnisse belegen, dass eine Optimierung der *in vivo* Datenerhebung zu einer Erhöhung der Vorhersagewerte der MLT führen würde.

Für die Dermatoskopie wurden durch Langley et al. (2007) geringfügig bessere Vorhersagewerte (NPV: 70%, PPV: 95%) ermittelt. Im Unterschied zur MLT ist jedoch die Dermatoskopie ein umfangreich erforschtes und in zahlreichen Studien optimiertes Verfahren (Annessi et al. 2007, Dolianitis et al. 2005).

Bewertung des Übereinstimmungsmaßes der Untersucher

Von weiterem Interesse war die einheitliche Anwendbarkeit gut definierter Differenzierungsmerkmale. Zur Bewertung dieses Sachverhaltes ermittelten wir das Maß der Urteilsübereinstimmung zwischen den Untersuchern bezüglich der einzelnen Kriterien. Die Ergebnisse der Kappa-Statistik zeigen eine gute Korrelation mit Werten zwischen 0,6 und 0,8. Daraus wird deutlich, dass die im Rahmen der Studie definierten Differenzierungsmerkmale des Malignen Melanoms weitestgehend einheitlich angewandt werden konnten.

Bewertung der logistischen Regressionsanalyse

Im Rahmen der Bildbeurteilung wurden alle Differenzierungsmerkmale in die diagnostischen Entscheidungen der Untersucher einbezogen. Durch das mathematische Verfahren der binären logistischen Regressionsanalyse war es möglich, für jeden Untersucher, die Merkmale/Merkmalsskombinationen zu ermitteln, die einen signifikanten Einfluss auf die Melanomdiagnose hatten. Derart gelang es, die Anzahl der notwendigen Merkmale unter annähernd gleich bleibender Vorhersagegenauigkeit deutlich zu reduzieren.

Es fand sich eine gute Merkmalsübereinstimmung bei den Untersuchern 1 und 4 mit Abweichungen der Untersucher 2 und 3 (Tab. 7). Insgesamt wurden alle Einzelmerkmale bei mindestens einem Arzt als signifikant ermittelt. Die logistische Regressionsanalyse zeigte, dass vor allem die Merkmale *destruierter Zellverband*, *unscharfe Zellgrenzen*, *pleomorphes Zellbild* und *dendritische Zellen* zur diagnostischen Klassifizierung melanozytärer Läsionen herangezogen werden

sollten. Ferner wurden Unterschiede in der Anwendung der einzelnen Merkmale zwischen den Untersuchern deutlich (vgl. Kappa-Statistik). Auch hier zeigt sich die Notwendigkeit weiterführender Schulungen zur Optimierung des Beurteilungsprozesses.

Die Ergebnisse der binären logistischen Regressionsanalyse verdeutlichen, dass unter Berücksichtigung nur weniger signifikanter Merkmale ähnliche bis bessere Klassifizierungsergebnisse im Vergleich zur Beurteilung aller Melanommerkmale erreicht werden konnten.

Im Rahmen der Regressionsanalyse wurde weiterhin die Wahrscheinlichkeit einer richtigen Klassifizierung (richtig benigne, richtig maligne) bestimmt. Diese als Genauigkeit bezeichnete Größe schwankte, je nach Untersucher und Datenmaterial, zwischen 81% und 97%. Im Vergleich dazu zeigten klinisch gestellte Diagnosen eine erfahrungsabhängige Klassifizierungsgenauigkeit von bis zu 80% (Morton und Mackie 1998). Durch die Anwendung der Dermatoskopie gelang es, bis zu 82% aller melanozytären Läsionen richtig zu klassifizieren (Annessi et al. 2007).

6.4 Fluoreszenzabklingkinetik

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für einzelne epidermale Zellpopulationen das Fluoreszenzabklingverhalten bestimmt. Wissenschaftliche Studien an NAD(P)H zeigten, dass die Lebensdauerkomponenten τ_1 und τ_2 den unterschiedlichen biochemischen Zustandsformen der reduzierten Pyridinnukleotide zuzuordnen sind (Koenig et al. 1997, Wakita et al. 1995). Man unterscheidet einen ungebundenen Zustand (τ_1) von einem gebundenen Zustand (τ_2) (Lakowicz et al. 1992). Derart gelang es das Fluoreszenzabklingverhalten von NAD(P)H als Indikator des zellulären Energiestoffwechsels zu nutzen (Bird et al. 2005, Niesner et al. 2004).

Im Allgemeinen ist die Fluoreszenzlebensdauer nicht nur vom Fluorophor selbst, sondern auch von zahlreichen biochemischen Parametern des Mikromilieus wie pH-Wert, Sauerstoffsättigung, Proteinbindung sowie der Ionen- und Glukosekonzentration, abhängig (Evans et al. 2005, Gerritsen et al. 1997, Lakowicz und Szmackinski 1993, Sanders et al. 1995). Im Rahmen neoplastischer Prozesse können verschiedene Faktoren das zelluläre Mikromilieu beeinflussen. Dazu zählen Veränderungen des genetischen Codes, der Durchblutung und Sauerstoffversorgung sowie proliferativ bedingte Änderungen des Energiebedarfs und der Stoffwechselwege (Warburg-Effekt, Pasteur-Effekt) (Gulledge und Dewhirst 1996, Schroeder et al. 2005, Warburg et al. 1924). Die zuvor genannten Faktoren verdeutlichen, dass die Fluoreszenzabklingkinetik endogener Biomoleküle zur Malignomdiagnostik herangezogen werden kann. So gelang es Bird et al. (2005) an menschlichen Brustzellen, mit steigender Zelldichte eine Abnahme von τ_1 und τ_2 bei NADH in vitro nachzuweisen. Pradhan et al (1995) fand bei verschiedenen malignen und metastasierenden Zelllinien eine generelle Abnahme der mittleren Fluoreszenzlebensdauer von NADH. Skala et al. (2007) untersuchte an präkanzerösen Hamsterwangenepithelien selektive Veränderungen der proteingebundenen τ_2 -Komponente und zeigte, dass deren Fluoreszenzlebensdauer von gesunden zu präkanzerösen Läsionen abnimmt. Anders als erwartet, konnte dieser Effekt in unseren Messungen nicht nachgewiesen werden. Im Unterschied zum Karzinom sind jedoch beim Melanom die Epithelzellen (Keratinozyten) nicht primär beteiligt. Maligne Veränderungen während der Melanomentwicklung betreffen vorrangig die Population der Melanozyten, bei der jedoch, aufgrund einer

unkontrollierten Melaninproduktion, die NAD(P)H-Fluoreszenz in den Hintergrund rückt.

Unsere quantitativen Messungen zeigten stark variierende Fluoreszenzabklingzeiten, die auf komplexe Wechselwirkungen verschiedener endogener Fluorophore und biochemischer Zustände zurückzuführen sind. Im Vergleich zu anderen Fluoreszenzlebensdauer-Studien wird deutlich, dass die keratinozytär gemessenen Werte mit den Lebensdauern von NAD(P)H sowie die melanozytär gemessenen Werte mit den Lebensdauern von Melanin korrespondieren (Bird et al. 2005, Ehlers et al. 2007, Schneckenburger et al. 2004).

Anhand der zuvor diskutierten Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass Fluoreszenzlebensdaueranalysen an einzelnen Messpunkten innerhalb des Zytoplasmas der Zellen eine Unterscheidung zwischen Keratinozyten und Melanozyten erlauben, nicht jedoch eine Differenzierung zwischen benignen und malignen melanozytären Läsionen.

Alternativ zur quantitativen FLIM untersuchten wir die Möglichkeiten einer qualitativen Beurteilung der detektierten Fluoreszenzabklingdaten. Durch eine farbcodierte Visualisierung der Fluoreszenzlebensdauer war es möglich, auf einfache und schnelle Art sowohl die Morphologie als auch die fluoreszenzdynamoschen Besonderheiten einer Läsion simultan zu erfassen. In den farbcodierten Darstellungen fand sich beim Malignen Melanom eine Infiltration suprabasaler Epidermisschichten durch pleomorphe Melanozyten. Diese konnten durch die kurze, gelb-codierte Fluoreszenzlebensdauer des Melanins deutlich vom blau-grün-codierten Keratinozytenverband abgegrenzt werden. Die zuvor diskutierten Phänomene unterstreichen den erweiterten Informationsgehalt der farbcodierten FLIM im Vergleich zu konventionellen Intensitätsmessungen sowie der quantitativen Fluoreszenzlebensdaueranalyse. Aufgrund der verhältnismäßig langen Aquisitionszeit von bis zu 3 Minuten wurden die FLIM-Messungen vorrangig an Biopsien durchgeführt.

6.5 Fluoreszenzspektren

Die gemessenen Emissionsspektren zeigten bei einer Anregungswellenlänge von 800 nm im Vergleich zu 760 nm eine diskrete Rotverschiebung, einen zusätzlichen Emissionspeak bei 400 nm sowie einen deutlichen Intensitätsverlust bei 470 nm. Erklärend dafür ist allgemein der Einfluss der Anregungswellenlänge auf die Fluoreszenz (Chen et al. 2006). Der bei 400 nm ($\lambda_{ex}/2$), im Bereich der dermoepidermalen Junktionszone, beobachtete Peak ist keine Fluoreszenzercheinung sondern die Folge von SHG-Effekten des Kollagens (Williams et al. 2005). In Übereinstimmung zu den Ergebnissen von Masters et al. (1997), Teuchner et al. (2000, 2003) und Laiho et al. (2005) konnte gezeigt werden, dass der Hauptemissionspeak bei 470 nm von den reduzierten Nicotinsäurederivaten (NAD(P)H) ausgeht und der bei 550 nm lokalisierte Fluoreszenzpeak auf das endogene Pigment Melanin zurückzuführen ist. Untersuchungen der Emissionsspektren von NAD(P)H *ex vivo* und *in vivo* an tierischen Herzmuskelzellen durch Huang et al. (2002) zeigten, dass die Fluorophore NADH und NADPH nahezu identische Emissionsspektren (Fluoreszenzpeak bei 470 nm) aufweisen. In der Literatur gefundene, teils geringfügig divergierende Angaben zu den Emissionsmaxima von NAD(P)H sowie Melanin lassen sich durch Unterschiede in der Genauigkeit der verwendeten Spektrometer und experimentell abweichende Anregungswellenlängen erklären (Chen et al. 2006).

Einzig beim Malignen Melanom fand sich ein ausgeprägtes Fluoreszenzmaximum im langwelligen Bereich des Emissionsspektrums bei ca. 550 nm. Interessanterweise erschien dieser Peak nicht nur im Stratum basale, wo er auch bei einem stark pigmentierten melanozytären Nävus zu erwarten wäre, sondern ebenso in den darüberliegenden Epidermisschichten. Ursächlich dafür sind neoplastische Melanozyten, die sich aus dem basalen Zellverband lösen und innerhalb der Epidermis aufsteigen.

Aufgrund der kleinen Anzahl von Messdaten sowohl bei den FLIM- als auch bei den Spektral-Untersuchungen können unsere Ergebnisse nicht verallgemeinert und auf die Gesamtheit der melanozytären Läsionen übertragen werden. In zukünftigen Studien mit größeren Probandenkollektiven gilt es, die zuvor beschriebenen Melanommerkmale zu evaluieren.

6.6 Vor- und Nachteile der MLT

Die Multiphotonen-Lasertomographie ist ein nichtinvasives, bildgebendes Verfahren, das eine Unterscheidung zwischen gutartigen und bösartigen melanozytären Läsionen anhand hochaufgelöster Gewebeschnittbilder erlaubt. Im Unterschied zu anderen dermatologisch angewandten Verfahren (Dermatoskopie, Sonographie, MRT, CLSM, OTC) stellt die MLT dem Untersucher umfangreiche Informationen zur Morphologie, zum Fluoreszenzabklingverhalten sowie zum Emissionsspektrum der melanozytären Hautveränderung zur Verfügung (Becker et al. 2007). Dadurch wird eine umfassende und mehrdimensionale Betrachtung maligner Prozesse ermöglicht. Die MLT kann ohne den Einsatz exogener Fluoreszenzfarbstoffe mit einem minimalen Zeitaufwand von 10-15 Minuten durchgeführt werden. Durch extrem kleine Anregungsvolumina im Femtoliter-Bereich wird eine „out of focus“ Strahlenbelastung weitestgehend verhindert (siehe Kap. 2.6). Die Anregungswellenlängen im NIR-Spektrum besitzen aufgrund der geringen Anzahl von NIR-Absorbern nur ein geringes Schädigungspotenzial (Xu et al. 1996). Untersuchungen zur Gefährdungsbeurteilung der MLT zeigten, dass messbare DNA-Strahlenschäden, vergleichbar zur 0,6-fachen minimalen Erythemdosis (MED) bei UV-Bestrahlung, erst bei einer Anregungsleistung von 60 mW bei Horizontalschnitten im 5 µm Abstand nachweisbar waren (Fischer et al. 2006).

Während der Studie traten verschiedene geräte- und verfahrenstechnische Einschränkungen auf. Die starre Anordnung des Messkopfes in einem festen Abstand zum Gerät erschwerte oder verhinderte einzelne Messungen im Bereich der Körpermitte, vorrangig bei adipösen Probanden, sowie bei anderen nicht horizontal zum Messkopf ausgerichteten Hautarealen (z. B. Intertrigines). Aufgrund des begrenzten Scanfeldes (siehe Kap. 4.6) war eine ganzheitliche Beurteilung der untersuchten Läsionen nur durch mehrere sequentielle Schnittbildstapel möglich. Durch den konstruktiv bedingten Arbeitsabstand der Fokussieroptik von 200 µm konnten Hautveränderungen im Bereich der Handflächen und Fußsohlen sowie tiefe dermale Strukturen nur unzureichend dargestellt werden. Dennoch ist gerade aufgrund der Anwendung langwelliger NIR-Strahlung die Eindringtiefe gegenüber der klassischen Einphotonen-Fluoreszenz-Mikroskopie mit Anregungswellenlängen im UV-Bereich deutlich verbessert worden (Helmchen und Denk 2005, McConnell 2006, Theer und Denk 2006).

6.7 Technische Optimierung der MLT

Der Multiphotonen-Lasertomograph DermalInspect wurde in dieser Studie erstmals im klinischen Umfeld betrieben. Probleme und Erfahrungen aus den *in* und *ex vivo* Messungen konnten durch die kooperative Zusammenarbeit mit dem Hersteller JenLab GmbH (Jena, Deutschland) analysiert und konstruktiv umgesetzt werden. Derart gelang es, das Gerät kontinuierlich weiterzuentwickeln und für den klinischen Einsatz optimiert zu gestalten. Bedeutende Neuerungen vollzogen sich in folgenden Bereichen:

Ein optimiertes Koppelstück mit einer abgeschrägten, nicht planen Oberfläche sorgte für bessere Zugänglichkeit und eine stärkere Fixierung des Untersuchungsareals. Dadurch konnte die Anzahl der Bewegungsartefakte während der Bildentstehung deutlich verringert werden.

Eine verbesserte schrittmotorgesteuerte Leistungsregelung mit automatischer Nullstellenkalibrierung erlaubte die präzise Leistungseinstellung in 0,5 mW-Schritten.

Die applikationsbezogene Weiterentwicklung der Oberflächensoftware JenLab Scan (JenLab GmbH, Jena, Deutschland) ermöglichte eine übersichtliche und schnelle Bedienung aller wichtigen Gerätefunktionen. Durch eine Standardisierung des Messvorganges konnten die einzustellenden Parameter auf die Anregungsleistung, die Bildaufnahmezeit sowie die Messtiefe reduziert werden.

Durch eine Teil-/Vollautomatisierung des Messvorganges und der Bildspeicherung verringerte sich die Untersuchungszeit deutlich. Der mit der Messung verbundene Zeitaufwand konnte so von anfänglichen 30-45 Minuten auf durchschnittlich 10-15 Minuten reduziert werden.

7 Schlussfolgerungen

1. Die MLT ist mit einem minimalen Zeitaufwand von 10-15 Minuten sowohl am Probanden als auch an Gewebeproben risikoarm durchführbar.
2. Epidermale Zellen können mit femtosekunden-gepulster NIR-Laserstrahlung (750-850 nm) zur Autofluoreszenz angeregt werden. Melaninhaltige Zellen zeigen gegenüber melaninfreien Zellen eine nahezu selektive Fluoreszenz bei Anregungswellenlängen ≥ 800 nm.
3. Die MLT ist eine geeignete Methode zur nichtinvasiven *in vivo* und *ex vivo* Bildgebung der Haut und erlaubt eine hochaufgelöste Visualisierung epidermaler und dermaler Strukturen bis zu einer Untersuchungstiefe von ca. 200 μm .
4. Melanozytäre Läsionen, insbesondere das Maligne Melanom, zeigen charakteristische morphologische Fluoreszenzmerkmale, die zur nichtinvasiven MLT-Diagnostik genutzt werden können.
5. Die MLT konnte, mit einer zur Dermatoskopie vergleichbaren Diagnosegenauigkeit, zur Differenzierung melanozytärer Läsionen angewandt werden.
6. NAD(P)H und Melanin als bedeutende epidermale Fluorophore unterscheiden sich grundlegend in den fluoreszenzdynamischen wie spektralen Eigenschaften.
7. Keratinozyten und Melanozyten zeigen abhängig vom Melaningehalt charakteristische Unterschiede in der Fluoreszenzintensität, im Fluoreszenzabklingverhalten und den Emissionsspektren.
8. Das Maligne Melanom ließ sich nicht nur morphologisch sondern auch fluoreszenzdynamisch sowie spektral von benignen melanozytären Läsionen abgrenzen.
9. Die MLT verfügt im Vergleich zu alternativen bildgebenden Verfahren (Dermatoskopie, Sonographie, MRT, OCT) über die höchste Auflösung. Sie kann sowohl morphologische als auch metabolische Veränderungen erfassen und ist als ergänzendes bildgebendes Verfahren zur Melanomfrüherkennung geeignet.

8 Literaturverzeichnis

- Annessi G, Bono R, Sampogna F, Faraggiana T, Abeni D.** 2007. Sensitivity, specificity, and diagnostic accuracy of three dermoscopic algorithmic methods in the diagnosis of doubtful melanocytic lesions: the importance of light brown structureless areas in differentiating atypical melanocytic nevi from thin melanomas. *J Am Acad Dermatol*, 56 (5):759-767.
- Argenziano G, Puig S, Zalaudek I, Sera F, Corona R, Alsina M, Barbato F, Carrera C, Ferrara G, Guilabert A, Massi D, Moreno-Romero JA, Munoz-Santos C, Petrillo G, Segura S, Soyer HP, Zanchini R, Malvehy J.** 2006. Dermoscopy improves accuracy of primary care physicians to triage lesions suggestive of skin cancer. *J Clin Oncol*, 24 (12):1877-1882.
- Bafounta ML, Beauchet A, Aegerter P, Saiag P.** 2001. Is dermoscopy (epiluminescence microscopy) useful for the diagnosis of melanoma? Results of a meta-analysis using techniques adapted to the evaluation of diagnostic tests. *Arch Dermatol*, 137 (10):1343-1350.
- Bauer J, Garbe C.** 2003. Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment Cell Res*, 16 (3):297-306.
- Becker W, Bergmann A, Biskup C.** 2007. Multispectral fluorescence lifetime imaging by TCSPC. *Microsc Res Tech*, 70 (5):403-409.
- Becker W, Bergmann A, Hink MA, König K, Benndorf K, Biskup C.** 2004. Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting. *Microsc Res Tech*, 63 (1):58-66.
- Bird DK, Yan L, Vrotsos KM, Eliceiri KW, Vaughan EM, Keely PJ, White JG, Ramanujam N.** 2005. Metabolic mapping of MCF10A human breast cells via multiphoton fluorescence lifetime imaging of the coenzyme NADH. *Cancer Res*, 65 (19):8766-8773.
- Braun RP, Rabinovitz HS, Oliviero M, Kopf AW, Saurat JH.** 2005. Dermoscopy of pigmented skin lesions. *J Am Acad Dermatol*, 52 (1):109-121.
- Byers HR, Maheshwary S, Amodeo DM, Dykstra SG.** 2003. Role of cytoplasmic dynein in perinuclear aggregation of phagocytosed melanosomes and supranuclear melanin cap formation in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 121 (4):813-820.
- Chance B, Thorell B.** 1959. Localization and kinetics of reduced pyridine nucleotide in living cells by microfluorometry. *J Biol Chem*, 234:3044-3050.
- Chen J, Zhuo S, Luo T, Jiang X, Zhao J.** 2006. Spectral characteristics of autofluorescence and second harmonic generation from ex vivo human skin induced by femtosecond laser and visible lasers. *Scanning*, 28 (6):319-326.

- Denk W, Strickler JH, Webb WW.** 1990. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248 (4951):73-76.
- Dolianitis C, Kelly J, Wolfe R, Simpson P.** 2005. Comparative performance of 4 dermoscopic algorithms by nonexperts for the diagnosis of melanocytic lesions. *Arch Dermatol*, 141 (8):1008-1014.
- Dössel O.** 2000. Bildgebende Verfahren in der Medizin. Von der Technik zur medizinischen Anwendung. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Dulon M, Weichenthal M, Blettner M, Breitbart M, Hetzer M, Greinert R, Baumgardt-Elms C, Breitbart EW.** 2002. Sun exposure and number of nevi in 5- to 6-year-old European children. *J Clin Epidemiol*, 55 (11):1075-1081.
- Ehlers A, Riemann I, Stark M, Koenig K.** 2007. Multiphoton fluorescence lifetime imaging of human hair. *Microsc Res Tech*, 70 (2):154-161.
- English DR, Armstrong BK.** 1994. Melanocytic nevi in children. I. Anatomic sites and demographic and host factors. *Am J Epidemiol*, 139 (4):390-401.
- Evans ND, Gnudi L, Rolinski OJ, Birch DJ, Pickup JC.** 2005. Glucose-dependent changes in NAD(P)H-related fluorescence lifetime of adipocytes and fibroblasts in vitro: potential for non-invasive glucose sensing in diabetes mellitus. *J Photochem Photobiol B*, 80 (2):122-129.
- Fischer F, Volkmer B, Puschmann S, Greinert R, Breitbart W, Kiefer J, Wepf R** (2006) Skin imaged by femtosecond laser irradiation: a risk assessment for in vivo applications. In: *Biophotonics and New Therapy Frontiers* SPIE: Strasbourg, France, 619105-619108.
- Fitzpatrick TB, Breathnach AS.** 1963. The Epidermal Melanin Unit System. *Dermatol Wochenschr*, 147:481-489.
- Franken PA, Hill AE, Peters CW, Weinreich G.** 1961. Generation of optical harmonics. *Phys Rev Lett*, 7 (4):118-120.
- Fritsch P.** 1998. Dermatologie und Venerologie. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Gallagher RP, McLean DI, Yang CP, Coldman AJ, Silver HK, Spinelli JJ, Beagrie M.** 1990. Suntan, sunburn, and pigmentation factors and the frequency of acquired melanocytic nevi in children. Similarities to melanoma: the Vancouver Mole Study. *Arch Dermatol*, 126 (6):770-776.
- Gambichler T, Moussa G, Sand M, Sand D, Altmeyer P, Hoffmann K.** 2005. Applications of optical coherence tomography in dermatology. *J Dermatol Sci*, 40 (2):85-94.
- Garbe C, Blum A.** 2001. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14 (5):280-290.
- Gerger A, Koller S, Weger W, Richtig E, Kerl H, Samonigg H, Krippel P, Smolle J.** 2006. Sensitivity and specificity of confocal laser-scanning microscopy for in vivo diagnosis of malignant skin tumors. *Cancer*, 107 (1):193-200.

- Gerritsen HC, Sanders R, Draaijer A, Levine YK.** 1997. Fluorescence lifetime imaging of oxygen in cells. *J Fluoresc*, 7:11-16.
- Goeppert-Mayer M.** 1931. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann Phys*, 9:273-294.
- Gryczynski I, Malak H, Lakowicz JR, Cheung HC, Robinson J, Umeda PK.** 1996. Fluorescence spectral properties of troponin C mutant F22W with one-, two-, and three-photon excitation. *Biophys J*, 71 (6):3448-3453.
- Gulledge CJ, Dewhirst MW.** 1996. Tumor oxygenation: a matter of supply and demand. *Anticancer Res*, 16 (2):741-749.
- Helmchen F, Denk W.** 2005. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods*, 2 (12):932-940.
- Hoffmann K, Stucker M, Altmeyer P, Teuchner K, Leupold D.** 2001. Selective femtosecond pulse-excitation of melanin fluorescence in tissue. *J Invest Dermatol*, 116 (4):629-630.
- Huang S, Heikal AA, Webb WW.** 2002. Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein. *Biophys J*, 82 (5):2811-2825.
- Huang Z, Zeng H, Hamzavi I, Alajlan A, Tan E, McLean DI, Lui H.** 2006. Cutaneous melanin exhibiting fluorescence emission under near-infrared light excitation. *J Biomed Opt*, 11 (3):34010.
- Junqueira LC, Carneiro J, Gratzl M.** 2004. *Histologie*. Berlin: Springer Verlag.
- Kaiser W, Garrett CGB.** 1961. Two-photon excitation in $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$. *Phys Rev Lett*, (7):229-231.
- Kittler H.** 2003. Use of digital dermoscopy to monitor melanocytic lesions: risks and benefits. *J Drugs Dermatol*, 2 (3):309-311.
- Koehler MJ, Koenig K, Elsner P, Buckle R, Kaatz M.** 2006. In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography. *Opt Lett*, 31 (19):2879-2881.
- Koehler MJ, Hahn S, Preller A, Elsner P, Ziemer M, Bauer A, König K, Buckle R, Fluhr JW, Kaatz M.** 2008. Morphological skin ageing criteria by multiphoton laser scanning tomography: non-invasive in vivo scoring of the dermal fibre network. *Exp Dermatol*, 17 (6):519-523.
- Koenig K.** 2008. Clinical multiphoton tomography. *J Biophoton*, 1 (1):13-23.
- Koenig K, Schneckenburger H.** 1994. Laser-Induced Autofluorescence for Medical Diagnosis. *Journal of Fluorescence*, 4:17-40.
- Koenig K, Riemann I.** 2003. High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. *J Biomed Opt*, 8 (3):432-439.

- Koenig K, Berns MW, Tromberg BJ.** 1997. Time-resolved and steady-state fluorescence measurements of beta-nicotinamide adenine dinucleotide-alcohol dehydrogenase complex during UVA exposure. *J Photochem Photobiol B*, 37 (1-2):91-95.
- Koenig K, Schneckenburger H, Meyer H, Rueck A.** 1995. Fluoreszenzverhalten und photodynamische Aktivität von *Propionibacterium acnes*. *Akt Dermatol*, 19:199-201.
- Koenig K, Ehlers A, Stracke F, Riemann I.** 2006. In vivo drug screening in human skin using femtosecond laser multiphoton tomography. *Skin Pharmacol Physiol*, 19 (2):78-88.
- Korting HC, Gottlöber P, Schmid-Wendtner M-H, Peter RU.** 1999. Ultraschall in der Dermatologie - Ein Atlas. Berlin, Wien [u.a.]: Blackwell-Wiss.-Verl.
- Laiho LH, Pelet S, Hancewicz TM, Kaplan PD, So PT.** 2005. Two-photon 3-D mapping of ex vivo human skin endogenous fluorescence species based on fluorescence emission spectra. *J Biomed Opt*, 10 (2):024016.
- Lakowicz JR, Szmajnski H.** 1993. Fluorescence-lifetime based sensing of pH, Ca^{2+} and glucose. *Actuator Chem*, 11:133-134.
- Lakowicz JR, Szmajnski H, Nowaczyk K, Johnson ML.** 1992. Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (4):1271-1275.
- Landis JR, Koch GG.** 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33 (1):159-174.
- Langley RG, Walsh N, Sutherland AE, Propperova I, Delaney L, Morris SF, Gallant C.** 2007. The diagnostic accuracy of in vivo confocal scanning laser microscopy compared to dermoscopy of benign and malignant melanocytic lesions: a prospective study. *Dermatology*, 215 (4):365-372.
- Lansing Taylor D, Salmon ED.** 1989. Basic fluorescence microscopy. In: Wang Y-L, Lansing Taylor D, Hrsg. *Methods in Cell Biology*. Boston: Academic Press, 207-237.
- Marmorstein AD, Marmorstein LY, Sakaguchi H, Hollyfield JG.** 2002. Spectral profiling of autofluorescence associated with lipofuscin, Bruch's Membrane, and sub-RPE deposits in normal and AMD eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43 (7):2435-2441.
- Masters BR, So PT.** 1999. Multi-photon Excitation Microscopy and Confocal Microscopy Imaging of In Vivo Human Skin: A Comparison. *Microscopy and Microanalysis*, 5 (4):282-289.
- Masters BR, So PT, Gratton E.** 1997. Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin. *Biophys J*, 72 (6):2405-2412.

- Masters BR, So PT, Gratton E.** 1998. Multiphoton excitation microscopy of in vivo human skin. Functional and morphological optical biopsy based on three-dimensional imaging, lifetime measurements and fluorescence spectroscopy. *Ann N Y Acad Sci*, 838:58-67.
- Mayer J.** 1997. Systematic review of the diagnostic accuracy of dermoscopy in detecting malignant melanoma. *Med J Aust*, 167 (4):206-210.
- McConnell G.** 2006. Improving the penetration depth in multiphoton excitation laser scanning microscopy. *J Biomed Opt*, 11 (5):054020.
- Morton CA, Mackie RM.** 1998. Clinical accuracy of the diagnosis of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol*, 138 (2):283-287.
- Niesner R, Peker B, Schlusche P, Gericke KH.** 2004. Noniterative biexponential fluorescence lifetime imaging in the investigation of cellular metabolism by means of NAD(P)H autofluorescence. *Chemphyschem*, 5 (8):1141-1149.
- Nordlund JJ, Ortonne JP.** 1998. The normal color of human skin. In: Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne JP, Hrsg. *The pigmentary system: physiology and pathophysiology*. New York: Oxford University Press, 475-486.
- Pena A, Strupler M, Boulesteix T, Schanne-Klein M.** 2005. Spectroscopic analysis of keratin endogenous signal for skin multiphoton microscopy. *Optics Express*, 13 (16):6268-6274
- Piston DW, Masters BR, Webb WW.** 1995. Three-dimensionally resolved NAD(P)H cellular metabolic redox imaging of the in situ cornea with two-photon excitation laser scanning microscopy. *J Microsc*, 178 (Pt 1):20-27.
- Pradhan A, Pal P, Durocher G, Villeneuve L, Balassy A, Babai F, Gaboury L, Blanchard L.** 1995. Steady state and time-resolved fluorescence properties of metastatic and non-metastatic malignant cells from different species. *J Photochem Photobiol B*, 31 (3):101-112.
- Quevedo WC, Holstein TJJ.** 1998. General biology of mammalian pigmentation. In: Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne JP, Hrsg. *The pigmentary system: physiology and pathophysiology*. New York: Oxford University Press, 43-58.
- Quevedo WC, Fitzpatrick JTB, Pathak MA, Jimbow K.** 1974. Light and skin color. In: Fitzpatrick TB, Pathak MA, Harber LC, Seiji M, Kukita A, Hrsg. *Sunlight and Man*. Tokyo: University of Tokyo Press, 165-194.
- Rajadhyaksha M, Gonzalez S, Zavislan JM, Anderson RR, Webb RH.** 1999. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology. *J Invest Dermatol*, 113 (3):293-303.
- Riemann I, Dimitrow E, Fischer P, Reif A, Kaatz M, Elsner P, Konig K (2004)** High-resolution multiphoton tomography of human skin in vivo and in vitro. In: *Femtosecond Laser Applications in Biology* SPIE: Strasbourg, France, 21-28.

- Rivers JK.** 2004. Is there more than one road to melanoma? *Lancet*, 363:728-730.
- Ruiz-Maldonado R, del Rosario Barona-Mazuera M, Hidalgo-Galvan LR, Medina-Crespo V, Duran-Mckinster C, Tamayo-Sanchez L, Mora-Tizcareno MA, Zuloaga A, de la Luz Orozco-Covarrubias M.** 1997. Giant congenital melanocytic nevi, neurocutaneous melanosis and neurological alterations. *Dermatology*, 195 (2):125-128.
- Sanders R, Draaijer A, Gerritsen HC, Houpt PM, Levine YK.** 1995. Quantitative pH imaging in cells using confocal fluorescence lifetime imaging microscopy. *Anal Biochem*, 227 (2):302-308.
- Schenke-Layland K, Riemann I, Damour O, Stock UA, Koenig K.** 2006. Two-photon microscopes and in vivo multiphoton tomographs-powerful diagnostic tools for tissue engineering and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 58 (7):878-896.
- Schmitt JM, Knuttel A, Yadlowsky M.** 1994. Confocal microscopy in turbid media. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*, 11 (8):2226-2235.
- Schneckenburger H, Wagner M, Weber P, Strauss WS, Sailer R.** 2004. Autofluorescence lifetime imaging of cultivated cells using a UV picosecond laser diode. *J Fluoresc*, 14 (5):649-654.
- Schroeder T, Yuan H, Viglianti BL, Peltz C, Asopa S, Vujaskovic Z, Dewhirst MW.** 2005. Spatial heterogeneity and oxygen dependence of glucose consumption in R3230Ac and fibrosarcomas of the Fischer 344 rat. *Cancer Res*, 65 (12):5163-5171.
- Singh S, Bradley LT.** 1964. Three-Photon Absorption in Napthalene Crystals by Laser Excitation. *Physical Review Letters*, 12 (22):612.
- Skala MC, Riching KM, Bird DK, Gendron-Fitzpatrick A, Eickhoff J, Eliceiri KW, Keely PJ, Ramanujam N.** 2007. In vivo multiphoton fluorescence lifetime imaging of protein-bound and free nicotinamide adenine dinucleotide in normal and precancerous epithelia. *J Biomed Opt*, 12 (2):024014.
- Stang A, Ziegler S, Buchner U, Ziegler B, Jockel KH, Ziegler V.** 2007. Malignant melanoma and nonmelanoma skin cancers in Northrhine-Westphalia, Germany: a patient- vs. diagnosis-based incidence approach. *Int J Dermatol*, 46 (6):564-570.
- Teuchner K, Ehlert J, Freyer W, Leupold D, Altmeyer P, Stücker M, Hoffmann K.** 2000. Fluorescence Studies of Melanin by Stepwise Two-Photon Femtosecond Laser Excitation. *Journal of Fluorescence*, 10 (3):275-281.
- Teuchner K, Mueller S, Freyer W, Leupold D, Altmeyer P, Stuecker M, Hoffmann K** (2003) Femtosecond two-photon-excited fluorescence of melanin. In: *Multiphoton Absorption and Nonlinear Transmission Processes: Materials, Theory, and Applications* SPIE: Seattle, WA, USA, 211-219.

- Theer P, Denk W.** 2006. On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*, 23 (12):3139-3149.
- Thody AJ, Higgins EM, Wakamatsu K, Ito S, Burchill SA, Marks JM.** 1991. Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis. *J Invest Dermatol*, 97 (2):340-344.
- Wakita M, Nishimura G, Tamura M.** 1995. Some characteristics of the fluorescence lifetime of reduced pyridine nucleotides in isolated mitochondria, isolated hepatocytes, and perfused rat liver in situ. *J Biochem*, 118 (6):1151-1160.
- Warburg O, Posener K, Negelein E.** 1924. Ueber den Stoffwechsel der Tumoren. *Biochemische Zeitschrift*, 152:319-344.
- Weedon D.** 1997. *Skin Pathology*. Edinburg: Churchill Livingstone.
- Welch HG, Woloshin S, Schwartz LM.** 2005. Skin biopsy rates and incidence of melanoma: population based ecological study. *Bmj*, 331 (7515):481.
- Westerhoff K, McCarthy WH, Menzies SW.** 2000. Increase in the sensitivity for melanoma diagnosis by primary care physicians using skin surface microscopy. *Br J Dermatol*, 143 (5):1016-1020.
- Williams RM, Zipfel WR, Webb WW.** 2005. Interpreting second-harmonic generation images of collagen I fibrils. *Biophys J*, 88 (2):1377-1386.
- Xu C, Zipfel W, Shear JB, Williams RM, Webb WW.** 1996. Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (20):10763-10768.
- Yamashita T, Kuwahara T, Gonzalez S, Takahashi M.** 2005. Non-invasive visualization of melanin and melanocytes by reflectance-mode confocal microscopy. *J Invest Dermatol*, 124 (1):235-240.
- Zhuo S, Chen J, Jiang X, Cheng X, Xie S.** 2007. Visualizing extracellular matrix and sensing fibroblasts metabolism in human dermis by nonlinear spectral imaging. *Skin Res Technol*, 13 (4):406-411.
- Zipfel WR, Williams RM, Christie R, Nikitin AY, Hyman BT, Webb WW.** 2003. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (12):7075-7080.
- Zoumi A, Yeh A, Tromberg BJ.** 2002. Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (17):11014-11019.

9 Anhang

Danksagung

Hiermit möchte ich Prof. Dr. Karsten König für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung der Arbeit danken. Ich danke Dr. Iris Riemann, Ernst Haupt und Volker Ulrich für die gute Einarbeitung in die Multiphotonen-Lasertomographie, die Betreuung und Unterstützung während der Datenerhebung sowie der Auswertung.

Der Firma JenLab GmbH danke ich für die technische Umsetzung der Studie und die Bereitstellung des Multiphotonen-Lasertomographen. Den Mitarbeitern der Firma, insbesondere Rainer Bückle, möchte ich für die technische Betreuung, die kontinuierliche Verbesserung des Verfahrens sowie die Unterstützung bei speziellen Messmethoden danken.

Den Mitarbeitern der Klinik für Dermatologie und dermatologische Allergologie der FSU Jena danke ich für die gute Zusammenarbeit sowie die Bereitstellung des Untersuchungsraumes und der Patienten. Genannt seien hier der Direktor der Klinik Prof. Dr. Peter Elsner sowie die Mitarbeiter der Stationen, der dermatochirurgischen und histopathologischen Abteilungen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Martin Kaatz und Prof. Dr. Johannes Norgauer für die kontinuierliche Betreuung und Unterstützung während der Promotionsarbeit. Weiterhin gilt mein Dank Dr. Mirjana Ziemer, Dr. Anja Bornkessel, Steven Goetze und Dr. Johannes Köhler für die Beurteilung der umfangreichen Untersuchungsdaten sowie die damit verbundenen konstruktiven Diskussionen.

Ich danke Claudia Hemmelmann vom Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der FSU Jena für die Hilfe und Betreuung während der statistischen Aufarbeitung der Daten, den Mitarbeitern der dermatologischen Fachbibliothek für die Literaturbeschaffung und nicht zuletzt Dr. Alexander Ehlers, der mich im Rahmen der FLIM-Auswertung kooperativ unterstützte sowie Dr. Maria Breternitz-Grühne, die mir beim Korrekturlesen der Arbeit hilfreich zur Seite stand.

Besonderer Dank gilt der Ernst-Abbe-Stiftung sowie meiner Familie, die den finanziellen Rahmen zur Durchführung dieser Promotion stellten.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Johannes Norgauer, Dr. Martin Kaatz, Dr. Iris Riemann, Dr. Mirjana Ziemer, Dr. Johannes Köhler, Steven Goetze, Dr. Maria Breternitz-Gruhne, Dipl.-Math. oec. Claudia Hemmelmann,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde, und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erfurt, 11.08.2008

Enrico Dimitrow